



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Wydział Farmaceutyczny

Prof. dr hab. n. farm. Maria Walczak

Katedra i Zakład Toksykologii

ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

e-mail: maria.walczak@uj.edu.pl; tel.
+4812/6205630

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Olgi Maliszewskiej

Kraków, dn. 5 września 2023 r.

Ocenę przygotowano na podstawie pisma Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, WFD-500-D-402/2022 z dn. 26 czerwca 2023 r.

Informacje ogólne

Podstawą ubiegania się mgr Olgi Maliszewskiej o stopień naukowy doktora jest 5 spójnych oryginalnych publikacji dotyczących tematyki zatytułowanej „*Optymalizacja metod chromatograficznych jako narzędzi analitycznych do pomiaru stężeń wybranych leków cytostatycznych w materiale biologicznym*”.

Rozprawa doktorska obejmuje 72 strony i składa się z wykazu skrótów użytych w pracy, zestawienia publikacji stanowiących rozprawę doktorską oraz publikacji Doktorantki, które nie wchodzi w skład pracy doktorskiej, spisu streszczeń zjazdowych, które są związane i nie związane z rozprawą doktorską, wstępu będącego wprowadzeniem do aspektu biologicznego i analitycznego tematu, celu pracy, omówienia publikacji z ich dyskusją, podsumowania, streszczenia w języku polskim i angielskim, bibliografii składającej się ze 123 pozycji ułożonych w sposób logiczny i uporządkowany oraz kopii publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. W dysertacji zamieszczono oświadczenie Doktorantki o jej wkładzie merytorycznym w osiągnięcie naukowe, natomiast nie zamieszczono oświadczeń współautorów.

Ocena rozprawy doktorskiej

Przedmiotem badań pracy doktorskiej mgr Olgi Maliszewskiej było opracowanie metod analitycznych do oznaczania stężenia wybranych leków cytostatycznych w materiale

biologicznym z zastosowaniem technik chromatograficznych. Część teoretyczna wprowadza czytelnika w temat epidemiologii i terapii chorób nowotworowych, pokazując złożoność problemu oraz wyzwania związane z analizą leków cytostatycznych. Oceniana praca doktorska wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Promotora dr hab. Aliny Plenis jest znakomitym przykładem kompleksowego podejścia do opracowania i walidacji metod bioanalitycznych w złożonych matrycach biologicznych. Ponieważ stale poszukuje się lepszych, szybszych i bardziej precyzyjnych metod bioanalitycznych, przedstawiona do recenzji praca doktorska dokumentująca opracowanie i walidację metod oznaczania stężenia wybranych leków cytostatycznych oraz przedstawiająca ich aplikację u dzieci poddanych leczeniu onkologicznemu, wpisuje się w aktualne trendy badań o wysokich walorach poznawczych i praktycznych.

Części teoretyczna pracy jest rzetelnym wprowadzeniem do zagadnień stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej i w sposób ciekawy wprowadza czytelnika do tematu chorób nowotworowych, antybiotyków antracyklinowych i taksanów. W pierwszej części wstępu Autorka nakreśliła zagadnienia związane z epidemiologią i charakterystyką nowotworów, metodami leczenia onkologicznego ze szczególnym zwróceniem uwagi na antracykliny oraz taksany oraz wskazała na konieczność prowadzenia leczenia pod kontrolą stężenia leku we krwi.

W drugiej części wstępu Doktorantka opisała proces opracowania metody bioanalitycznej z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. W tym aspekcie Autorka zwróciła uwagę na proces optymalizacji nowej metody chromatograficznej, związany z doбором rodzaju fazy stacjonarnej, temperatury rozdzielania chromatograficznego, składu i szybkości przepływu fazy ruchomej, objętości dozowanej próbki, rodzaju użytego detektora, warunki ekstrakcji analitu, a w efekcie końcowym przeprowadzenie walidacji metody, zgodnie z wytycznymi FDA oraz ICH.

Po lekturze wstępu nasuwa się pytanie o syntetyczny przegląd technik bioanalitycznych stosowanych w analizie leków przeciwnowotworowych, z wyszczególnieniem wad i zalet poszczególnych technik, które potwierdziłyby złożoność problemu. Lektura wstępu zdradza dobre przygotowanie Doktorantki do prowadzenia badań w wyznaczonym obszarze tematycznym. Podsumowując, w rozdziale tym Autorka w sposób przejrzysty i zwięzły dowiodła bardzo dobrej znajomości badanej problematyki.

Kolejną częścią dysertacji jest **cel pracy**, wytyczony precyzyjnie i klarownie. Podzielony został na 12 cząstkowych punktów, których osiągnięcie zostało udowodnione w publikacjach naukowych. Do głównych założeń celu badań należy opracowanie i walidacja metod bioanalitycznych do oznaczania stężenia wybranych leków przeciwnowotworowych w osoczu i moczu pacjentów poddanych leczeniu onkologicznemu. Badania wykonano w dwóch etapach. Pierwszy etap obejmował opracowanie metody oznaczania doksorubicyny, epirubicyny i idarubicyny w moczu i osoczu krwi ludzkiej oraz tkankach zwierzęcych (doksorubicyna) z zastosowaniem chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną. Drugi etap dotyczył opracowania metody oznaczania docetakselu w moczu i osoczu krwi ludzkiej z zastosowaniem techniki LC/MS/MS. Zaprezentowany cel sygnalizuje szeroki zakres pracy włożonej w realizację ambitnych założeń, co znalazło potwierdzenie w publikacjach naukowych, które weszły w skład rozprawy doktorskiej.

W kolejnej części pracy omówiono pięć publikacji włączonych w rozprawę doktorską, opublikowanych w impaktowanych czasopismach z listy JCR w latach 2018-2023. Doktorantka dokładnie opisała zastosowane procedury badawcze, które pozwoliły na szczegółowe śledzenie zaplanowanych etapów badań i uzyskane wyniki. Wykonanie tych badań wymagało przeprowadzenia dużej ilości czasochłonnych i pracochłonnych oznaczeń chromatograficznych. W rozdziale tym Autorka uzasadniła wybór detekcji fluorescencyjnej do oznaczania antybiotyków antracyklinowych i przewagę tej techniki w stosunku do detekcji masowej, której użyto do oznaczania docetakselu w próbkach klinicznych pochodzących od pediatrycznych pacjentów onkologicznych. Badania do pracy doktorskiej wykonano we współpracy z Kliniką Pediatrii, Hematologii i Onkologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, po uzyskaniu zgody Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nie podano w rozprawie numeru zgody).

We wszystkich pracach Doktorantka precyzyjnie opisuje wszystkie kroki związane z preparatyką próbek, wykorzystane metody analityczne oraz zastosowaną walidację opracowanych metod. Szczegółowe i krytyczne, podejście do aspektu opracowania metody bioanalitycznej warte jest podkreślenia, gdyż pokazuje zrozumienie ważności tego etapu prac i jego wpływu na wyniki badań właściwych próbek, a tym samym interpretację biologiczną uzyskanych wyników i dowodzi wysokiej jakości przeprowadzonych badań. W tym aspekcie, pomocnym byłoby zapoznanie czytelnika z zastosowanym zapleczem instrumentalnym oraz podanie testów statystycznych, którymi Autorka posłużyła się do opracowania wyników przeprowadzonych analiz.

W **pierwszej pracy**, opublikowanej w *J. Pharm. Biomed. Anal.* w 2018 r. opisano proces optymalizacji metody bioanalitycznej oznaczania doksorubicyny w ludzkim osoczu i moczu na potrzeby terapii pod kontrolą stężenia leku we krwi u dzieci w trakcie leczenia onkologicznego. W pracy tej podkreślono zalety detekcji fluorescencyjnej i wartość aplikacyjną tej techniki do oznaczania stężenia związków o naturalnych właściwościach fluorescencyjnych w laboratoriach przyszpitalnych i klinicznych. Doksorubicynę oznaczano w warunkach izokratycznych, stosując inne proporcje rozpuszczalników dla próbek osocza i moczu. Czy Doktorantka może wyjaśnić czym była podyktowana taka rozbieżność? W publikacji tej Doktorantka opisała różne sposoby ekstrakcji analitu z osocza i moczu, w tym odbiałczanie, ekstrakcję typu ciecz-ciecz oraz ekstrakcję do fazy stałej, uzyskując w efekcie najwyższą wydajność ekstrakcji po wcześniejszym zakwaszeniu osocza i moczu 0,1 M kwasem solnym i zastosowaniu techniki SPE. Czy sprawdzono, w jaki sposób zakwaszenie próbek osocza i moczu wpłynie na wydajność procesu odbiałczania i ekstrakcji typu ciecz-ciecz? Analizując parametry walidacyjne metody, czym Autorka wytłumaczy różnice w liniowości metody pomiędzy osoczem (1 - 1000 ng/mL) a moczem (1 - 25000 ng/mL)? Jakie jest odchylenie standardowe dla LOQ? Proszę o wyjaśnienie pojęcia „zróżnicowane warunki eksperymentalne”, które zastosowano do oznaczenia stabilności tego cytostatyku. Pomocnym byłoby wyjaśnienie w jakich przedziałach czasowych pobierano próbki krwi i moczu od pacjentów. Z uwagi na dożylnie podawanie leku, w jaki sposób pobierano od pacjenta próbki krwi do oznaczeń bioanalitycznych?

W **drugiej pracy**, opublikowanej w *J. Chromatogr. B.* w 2019 r. opisano proces opracowania i walidacji metody oznaczania epirubicyny w ludzkim osoczu i moczu z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną i

aplikację tej metody do terapeutycznego monitorowania stężenia tego leku u pacjentów onkologicznych. W tym aspekcie zagospodarowano lukę związaną z brakiem w literaturze naukowej metod bioanalitycznych pozwalających na oznaczanie stężenia tego leku w moczu chorych. W tym względzie sprawdzono efektywność rozdzielania chromatograficznego leku z użyciem sześciu kolumn chromatograficznych o zróżnicowanych wymiarach i wypełnionych złożem krzemionkowym z modyfikowanymi grupami C12, C18 i fenyłowymi. Testowano również różne mieszaniny faz ruchomych oraz optymalizowano warunki ekstrakcji analitu. Elementem nowatorskim tych badań było udowodnienie, że użycie siarczanu cynku istotnie poprawia wydajność procesu ekstrakcji i pomaga w oczyszczeniu próbek moczu lecz nie osocza z substancji interferujących. Czy Doktorantka może podać przykładowe substancje interferujące? Podobnie jak w publikacji nr 1, uzyskano prawie 10 krotnie większy zakres liniowości w moczu niż w osoczu. Proszę o wyjaśnienie, z czego mogą wynikać tak znaczne różnice? Podobnie jak w pracy nr 1, proszę o podanie wartości odchylenia standardowego dla LOQ. Podanie we wlewie epirubicyny, podobnie jak doksorubicyny skutkowało fluktuacją stężeń tych leków w osoczu, po zakończeniu wlewu. Czy na podstawie wiedzy na temat glikoproteiny P, Doktorantka może wyjaśnić widoczny na rycinach przebieg stężeń?

W **trzeciej pracy**, opublikowanej w *Molecules* w 2020 r. opisano optymalizację i walidację metody oznaczania idarubicyny w osoczu i moczu ludzkim na potrzeby monitorowania stężenia tego leku we krwi chorych. W pracy tej zbadano proces ekstrakcji analitów z zastosowaniem nowatorskiej metodyki mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). Z uwagi na brak w literaturze naukowej danych na temat użycia tej techniki do izolacji antybiotyków antracyklinowych, zaprezentowana metodyka okazała się innowacyjna w stosunku do rozwiązań analitycznych dostępnych w bazach naukowych. Podobnie jak w publikacjach nr 1 i 2, uzyskano prawie 4 krotnie większy zakres liniowości w moczu niż w osoczu. Pomocnym byłoby wyjaśnienie z czego mogą wynikać tak znaczne różnice? Podobnie jak w pracy nr 1 i 2, proszę o podanie wartości odchylenia standardowego dla LOQ. Z uwagi na wielokrotne podawanie leku, czy uzyskano stężenie stacjonarne?

W **czwartej pracy**, opublikowanej w *Separations* w 2023 r. opisano metodę oznaczania doksorubicyny w tkankach zwierzęcych oraz zastosowanie tej metody w badaniach farmakokinetycznych oraz klinicznych doksorubicyny wprowadzanej na rynek w nowych postaciach farmaceutycznych. W pracy tej skupiono się przede wszystkim na doborze wydajnej, efektywnej i szybkiej procedury ekstrakcji leku ze złożonej matrycy biologicznej, jaką jest tkanka zwierzęca. W efekcie, najefektywniejszy okazał się protokół izolacji i oczyszczania analitu z zastosowaniem metody SPE ze złożem HLB w połączeniu z analizą chromatograficzną, z detekcją fluorescencyjną (SPE-LC-FL). Zastosowanie kolumnienek ze złożem HLB stanowiło nowość tych badań.

W **piątej pracy**, opublikowanej w *Pharmaceutics* w 2023 r. opisano metodę oznaczania docetakselu w osoczu i moczu ludzkim z zastosowaniem innowacyjnej metody dyspersyjnej mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz (DLLME) oraz LC/MS/MS. W pracy tej skupiono się na opracowaniu szybkiego i efektywnego rozdzielania chromatograficznego, które pozwoliłoby na zastosowanie zaproponowanego rozwiązania analitycznego w klinice. W efekcie wykonanych analiz znacznie skrócono czas elucji związku na kolumnie chromatograficznej. Czy Autorka na podstawie stężeń docetakselu zmierzonych u pacjenta włączanego do publikacji może wyjaśnić hipotezę o modelu trójkompartmowym tego cytostatyku?

Streszczenie stanowi rzetelną syntezę tematu odzwierciedlającą poszczególne części rozprawy, podkreślając najważniejsze informacje opisane w szczegółach w publikacjach.

Struktura i forma wyników badań zaprezentowanych w publikacjach jest czytelna i umożliwia łatwe poruszanie się czytelnika po opisywanych zagadnieniach. W przedstawionej do recenzji pracy, badania zaplanowano w sposób przemyślany, wyniki przedstawiono w sposób jasny i precyzyjny, a dyskusja jest merytoryczna i oparta na odpowiednio dobranych anglojęzycznych pozycjach literaturowych. Na wyróżnienie zasługuje bardzo staranna analiza merytoryczna uzyskanych wyników walidacji i poprawne wyciągnięcie wniosków, co zostało przedstawione w sposób spójny i czytelny. Opisy procedur zostały podane w sposób przejrzysty, umożliwiając odtworzenie bogatej części eksperymentalnej doktoratu. Różnorodność stosowanych w badaniach technik separacyjnych, niewątpliwie wymagała od Doktorantki solidnego przygotowania i sporej ilości czasu niezbędnego do ich opanowania.

Pod względem edytorskim, pomimo kilku potknięć, praca została zredagowana bardzo starannie. Pracę charakteryzuje wartość aplikacyjna uzyskanych wyników badań. Wyniki, które oceniam bardzo wysoko, świadczą o samodzielności naukowej i badawczej Autorki, swobodzie poruszania się w zagadnieniach z obszaru bioanalizy, a w szczególności w tematyce opracowania i walidacji metod bioanalitycznych oraz umiejętności rozwiązywania problemów metodologicznych. Uzyskane wyniki, w znacznym stopniu poszerzają wiedzę w obszarze oznaczeń ilościowych leków z złożonych matrycach biologicznych. Rozprawa jest skonstruowana w sposób estetyczny i przejrzysty. Doktorantka swobodnie posługuje się precyzyjnym językiem naukowym i adekwatnie stosuje terminologię związaną z przedmiotem pracy.

W pracy nie znaleziono błędów interpunkcyjnych, ortograficznych lub gramatycznych, jedynie drobne błędy literowe na str. 24, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 37, 39, 42, 43, 44, 48. Powyższe błędy nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Podsumowanie

Reasumując należy stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr Olgi Maliszewskiej jest oryginalnym i kompleksowym opracowaniem dotyczącym optymalizacji metod chromatograficznych do oznaczania stężenia wybranych leków cytostatycznych w ludzkim osoczu i moczu oraz tkankach zwierzęcych (docetaksel), świadcząc o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki. Analizy zostały wykonane metodycznie poprawnie, z użyciem odpowiednich narzędzi badawczych, a Doktorantka przy ich wykonywaniu i opracowywaniu wyników wykazała się odpowiednią wiedzą merytoryczną. Wyniki badań zostały opublikowane w pięciu oryginalnych publikacjach, w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, takich jak *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2018); *J. Chromatogr. B.* (2019); *Molecules* (2020); *Separations* (2023) oraz *Pharmaceutics* (2023). W 4 pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, co potwierdza jej wiodącą rolę w przeprowadzeniu badań, opracowaniu wyników oraz pisaniu publikacji.

Podjęte badania są niezwykle ważne ze względu na możliwość aplikacji uzyskanych wyników w obszarze farmacji klinicznej, w szczególności prowadzenia terapii pod kontrolą stężenia. Z uwagi na rosnącą każdego roku zapadalność na choroby nowotworowe i związane z tym poszukiwanie nowych leków przeciwnowotworowych, jak również wskazanie na konieczność monitorowania stężenia znanych leków cytostatycznych, podjęte w pracy

doktorskiej przez mgr Olę Maliszewską zadanie opracowania wydajnych technik ekstrakcji leków z matryc biologicznych oraz nowych, ulepszonych metod bioanalitycznych wpisuje się w aktualny nurt badań, a tematyka poruszana przez Autorkę ma znaczenie praktyczne, w dziedzinach związanych terapią onkologiczną dzieci i młodzieży. Biorąc pod uwagę zakres prac, uzyskane przez Doktorantkę wyniki należy uznać za znaczącą nowość naukową i niewątpliwie duże Jej osiągnięcie badawcze.

We **wniosku końcowym** stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, pt. „*Optymalizacja metod chromatograficznych jako narzędzi analitycznych do pomiaru stężeń wybranych leków cytostatycznych w materiale biologicznym*” cechuje się istotnymi walorami, do których zalicza się adekwatną do postawionych zadań metodykę, aktualność i wartość aplikacyjną uzyskanych wyników oraz wartościową dyskusję dowodzącą wiedzy i opanowania tematu przez Doktorantkę. Rozprawę doktorską uważam za interesującą i ważną w kontekście badania skuteczności farmakoterapii lekami cytostatycznymi. Dysertacja mgr Olgi Maliszewskiej w pełni odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art. 187. - [Rozprawa doktorska] i wnoszę do Rady Nauk farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Olgi Maliszewskiej do publicznej obrony też przedstawionych w dysertacji.

Ze względu na wysoki poziom przedstawionej dysertacji, bogaty warsztat badawczy, różnorodność zastosowanych technik analitycznych, istotne walory poznawcze i aplikacyjne opracowanych metod bioanalitycznych oraz na fakt wiodącej roli Doktorantki w publikacji uzyskanych wyników, w czasopismach z Listy Filadelfijskiej, zwracam się do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. n. farm. Maria Walczak



Katedra Toksykologii UCM
Zakład Toksykologii

prof. dr hab. Maria Walczak
kierownik Katedry i Zakładu