



prof. dr hab. n. farm. Łukasz Komsta
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Chemii Leków
ul. Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin, tel. 81 4487387, fax 81 4487381

Recenzja pracy doktorskiej mgr Olgi Maliszewskiej

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

OZNACZANIE substancji leczniczych w materiale biologicznym jest istotnym etapem badań klinicznych, sądowych oraz terapii monitorowanej. Metody analityczne podlegają ciągłemu udoskonalaniu ze względu na rozwój technik instrumentalnych, konieczność dostosowania do specyficznych matryc i substancji towarzyszących, konieczności zwiększania czułości, jak również redukcji kosztów oznaczeń. Wszystkie wysiłki podjęte w tym celu zasługują na poparcie i uznanie.

Choroby nowotworowe są jednymi z najistotniejszych problemów cywilizacyjnych i przyczyną istotnej ilości zgonów. Opracowanie skutecznej terapii tych schorzeń stanowi nieustanne wyzwanie dla współczesnej nauki. Chemioterapia jest ciągle jednym z podstawowych sposobów leczenia w onkologii, jednakże istotne objawy niepożądane wciąż zmuszają do szukania lepszych alternatyw lub ich minimalizowania.

Leki cytostatyczne są szczególnym celem opracowywania metod analitycznych ze względu na wąski indeks terapeutyczny i związaną z tym potrzebę monitorowania stężeń leku we krwi. Obserwuje się wzrost zainteresowania terapią monitorowaną nowotworów co sprawia, że ta tematyka jest wciąż aktualna. W ten trend badawczy wpisuje się dysertacja przedłożona do recenzji dysertacja doktorska napisana pod kierunkiem dr hab. ALINY PLENIS. Stanowi cykl sześciu publikacji o łącznym współczynniku IF równym 6.524 i punktacji ministerialnej równej 100.

Wkład Doktorantki w ich powstanie jest wiodący i zgodnie z oświadczeniem obejmował współudział w tworzeniu koncepcji prac, samo wykonanie eksperymentów, opracowanie i interpretację wyników oraz współudział podczas procesu edytorskiego w czasopismach. Rozprawa udowadnia ponadto

ogólną wiedzę teoretyczną Autorki w uprawianej dziedzinie oraz samodzielność prowadzenia pracy naukowej. Należy zatem stwierdzić, że spełnione zostały wymagania Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*¹.

Do publikacji dołączony jest zawierający ponad 70 stron (i ponad 120 pozycji bibliograficznych) autoreferat-komentarz, prezentujący jednocześnie wyniki badań w języku polskim. W jego wstępie Doktorantka omówiła epidemiologię i charakterystykę nowotworów, aktualne sposoby leczenia i podział stosowanych leków i założenia terapii monitorowanej. Przedstawiła także najczęściej spotykane problemy i wyzwania pojawiające się podczas opracowywania metod analitycznych.

Doktorantka postawiła sobie za cel optymalizację metod oznaczania doksorubicyny, epirubicyny i idarubicyny w moczu, osoczu krwi oraz tkankach techniką chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną). Wymagało to optymalizacji warunków procesu chromatograficznego, izolacji tych związków z matryc biologicznych, zwalidowania metod chromatograficznych zgodnie z wymaganiami FDA oraz ICH. Dodatkowo potwierdzono użyteczność opracowanej metodyki w praktyce klinicznej oraz w badaniach z udziałem zwierząt laboratoryjnych (analiza tkanek szczura, takich jak wątroby, nerki, płuca, serca, śledziony).

Drugim wątkiem pracy było opracowanie metody oznaczania docetakselu w moczu i osoczu techniką LC-MS/MS. W ramach tego Doktorantka zoptymalizowała proces chromatograficzny, metodykę izolacji docetakselu ze wspomnianych matryc, zwalidowała metodę zgodnie z wymaganiami FDA oraz ICH oraz potwierdziła jej przydatność w praktyce klinicznej.

Publikacje stanowiące cykl rozprawy są bardzo obszerne. Zawierają rozbudowany wstęp z licznymi odnośnikami literaturowymi, wyczerpującą dyskusję oraz rozległą bibliografię. Biorąc pod uwagę prestiż czasopism należy założyć, że zostały poddane przed opublikowaniem rygorystycznej recenzji i wyszły z tego przeżycia obronną ręką.

Ich lektura nie nasuwa żadnych wątpliwości merytorycznych, a nowość naukowa i postęp w porównaniu z wcześniej zaproponowanymi metodami jest oczywisty:

- (I) Wydajność opracowanej metody ekstrakcji doksorubicyny z krwi i moczu była wyraźnie wyższa w porównaniu do wcześniej opublikowanych, limity detekcji metody były nieco lepsze, a czas

¹Dz. U. z 2023 r. poz. 742, 1088, 1234, 1672

analizy wyraźnie krótszy. Dla analizy doksorubicyny w tkankach szczura po raz pierwszy w historii opracowano metodę SPE ze złożem HLB.

- (II) Opracowana metoda analizy epirubicyny charakteryzuje się również wyraźnie krótszym od poprzednich czasem trwania, niższymi limitami detekcji i zredukowaną wymaganą objętością próbki. Dodatkowo po raz pierwszy opisuje metodę możliwą do zastosowania zarówno w moczu, jak i w osoczu.
- (III) W przypadku analizy idarubicyny procedura SPE ze złożem HLB została opisana w literaturze po raz pierwszy. Udało się również zredukować wymaganą objętość próbki i skrócić czas analizy.
- (IV) Do analizy docetakselu po raz pierwszy w literaturze zaproponowano mikroekstrakcję, a dodatkowo wykazano trójkompartimentowość farmakokinetyki tego leku.
- (V) Zastosowanie detekcji fluorymetrycznej pozwala na znaczne ograniczenie kosztów aparatury służącej do analizy, przy zachowaniu zbliżonej, wystarczającej selektywności w porównaniu do metod opartych na detekcji masowej.
- (VI) Każda opracowana metoda jest skutecznie wdrożona w praktyce, co w dobie zalewu literatury metodami niewdrożonymi przenosi publikacje z recenzowanej pracy na zupełnie inny, wyższy poziom.

Poniższe przemyślenia, jakie nasunęły mi się podczas lektury, nie stanowią o jakichkolwiek uchybieniach, a są jedynie zachętą do ewentualnej dyskusji na obronie pracy:

1. W pierwszej publikacji wyraźnie rozgraniczono fazę o proporcjach 33:67 dla osocza i 32:68 dla moczu. Różnią się one jednym punktem procentowym stężenia objętościowego, zatem można założyć, że jest to na granicy *robustness*. Dlaczego tak mała różnica była na tyle istotna, że nie dało się zastosować jednej fazy do obu matryc?
2. Czy zastosowanie metodyki DoE (projektowania eksperymentu) mogłoby doprowadzić do szybszej lub skuteczniejszej optymalizacji warunków analizy?
3. Czy na podstawie otrzymanych wyników możliwe jest nie tylko stwierdzenie czasu osiągnięcia maksymalnego stężenia leków, ale również oszacowanie modelu farmakokinetycznego (rzędowości kinetyki, czasu półtrwania itd.)? Jeśli tak, to czy parametry te są zbieżne z wcześniejszymi

- badaniami w tym zakresie? W pracy wniosek o rzędowości kinetyki dotyczy jedynie docetakselu.
4. Jaka drogą cytostatyki mogłaby zostać wchłonięta w przypadku wspomnianej ekspozycji na mocz pacjenta o ich wysokim stężeniu?
 5. Czy istnieją dane literaturowe na temat biodegradacji cytostatyków? Na ile ich wprowadzanie wraz z moczem do kanalizacji może być istotnym problemem?
 6. Czy byłoby możliwe zastosowanie w opracowanych metodach zamiast acetonitrylu bardziej przystępnego ekologicznie rozpuszczalnika, np. metanolu? Pozwoliłoby to nie tylko na ekologiczną optymalizację ekstrakcji, ale również samej chromatografii.

Podsumowując, praca doktorska mgr Olgi Maliszewskiej spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, zawiera istotne elementy nowości naukowej i wnioskuje o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo, świadom zastosowania wszystkich opracowanych metod w praktyce klinicznej, a co za tym idzie wyjątkowego stopnia wdrożeniowości przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej oraz jej istotnej roli w ratowaniu życia chorych na choroby nowotworowe, z przyjemnością wnioskuje o wyróżnienie przedłożonej mi do recenzji pracy.

Katedra i Zakład Chemii Leków
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
prof. dr hab. Łukasz Komsta

Lublin, 11 września 2023.