



UNIwersytet Medyczny we Wrocławiu
Wydział Farmaceutyczny
ul. Borowska 211 A, 50-556 WROCLAW

Prof. dr hab. Janusz Pluta
tel.(71) 784-0 411
E-mail: janusz.pluta@umed.wroc.pl

Ocena

rozprawy doktorskiej pt. „Wykorzystanie ekstrakcji w punkcie zmętnienia do oznaczania wybranych substancji sercowo-naczyniowych w osoczu metodą chromatografii cieczowej powiązanej ze spektrometrią mas” wykonanej w Zakładzie Bioanalizy i Analizy Leków Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego przez mgr farmacji Grzegorza Kojro pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Wroczyńskiego (promotor) i dr hab. Joanny Giebułtowicz (promotor pomocniczy).

Uzyskanie odpowiedniej skuteczności prowadzonej farmakoterapii i gwarancji zminimalizowania działań niepożądanych jest możliwe pod warunkiem przestrzegania zasad tzw. farmakoterapii zindywidualizowanej, tj. .prowadzenia terapii monitorowanej stężeniami leków w surowicy krwi lub w innych płynach fizjologicznych. Pozwala ona na zoptymalizowanie dawkowania leków, utrzymującego stężenie leku w zakresie jego stężenia terapeutycznego. Takie postępowanie wymaga posiadania odpowiedniego zaplecza laboratoryjnego, dysponującego odpowiednim zapleczem aparaturowym i metodyką pozwalającą na wykonanie stosownych oznaczeń. Biorąc powyższe pod uwagę **uważam, że podjęta przez Doktoranta w badaniach tematyka jest aktualna, posiada odpowiedni potencjał aplikacyjny i jest jak najbardziej uzasadniona.** Wpisuje się ona w tematykę, mającą na celu poszerzenie możliwości analitycznych koniecznych w terapii monitorowanej.

Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi cykl monotematycznych, opublikowanych czterech publikacji. Trzy, z załączonych publikacji, to prace o charakterze eksperymentalnym, a jedna stanowi szeroki przegląd piśmiennictwa

krajowego i zagranicznego na temat możliwości zastosowania ekstrakcji w punkcie zmętnienia, jako metody oczyszczania badanych próbek w trakcie oznaczania stężenia leków w osoczu. **Stanowi ona dobre uzasadnienie wyboru tematyki prowadzonych badań**, tym bardziej, że cytowana w niej bibliografia pochodzi w większości z ostatnich lat. Wartym podkreślenia jest fakt, że **przedstawione w doktoracie prace zostały opublikowane w znanych czasopismach zagranicznych, posiadających sumaryczny współczynnik wpływu 12.255 i punktację ministerialną 215.**

Pewnym niedociągnięciem redakcyjnym ze strony Doktoranta, utrudniającym pracę recenzentowi, było pominięcie przeprowadzenia analizy bibliograficznej przesłanej do recenzji pracy.

Zamieszczone w opracowaniu doktorskim publikacje zostały dodatkowo zaopatrzone w stosowny komentarz, uzasadniający podjęcie tematyki badań, jak również określający ich cel, zastosowane metody i główne kierunki. Odrębną ich część stanowi dobrze napisana dyskusja otrzymanych wyników i podsumowanie zawierające główne osiągnięcia pracy.

W swoich badaniach Pan mgr Grzegorz Kojro postanowił sprawdzić, czy metoda ekstrakcji w punkcie zmętnienia (CPE) może być alternatywą w oznaczaniu leków w osoczu ludzkim. Dotychczasowa praktyka analityczna, najczęściej posługuje się przy izolacji substancji leczniczych, z materiału biologicznego, ekstrakcją cieczy-ciecz (LLE). Metodyka ta, wg. Doktoranta, pomimo, że jest szybka, tania i ma niewielkie wymagania sprzętowe, obarczona jest koniecznością użycia toksycznych rozpuszczalników organicznych, co wywiera negatywny wpływ na środowisko i nie jest obojętna dla zdrowia personelu.

Istotą metody CPE, proponowanej jako alternatywnej, jest dodanie do badanej próby surfaktantu w ilości nieco przewyższającej krytyczne stężenie micelarne, co spowoduje powstanie w niej fazy bogatej w środek powierzchniowo czynny i fazy wodnej. Substancje lecznicze mają powinowactwo do fazy micelarnej i po rozdzieleniu faz, na drodze dekantacji, mogą być oznaczane metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-ESI-MS/MS).

Metoda CPE, proponowana przez Doktoranta, jest z powodzeniem stosowana w badaniach środowiskowych do oznaczania metali i związków organicznych. Jednocześnie z dokonanego przez Doktoranta przeglądu literaturowego wynika, że metoda ta była stosowana również do ekstrakcji wielu substancji leczniczych.

Ograniczeniem jednak do jej stosowania jest możliwość wystąpienia, szczególnie w oznaczeniach wykonywanych chromatografią cieczową w połączeniu ze spektrometrią mas, znacznego efektu matrycowego, tj. wzmocnienia sygnału powodowanego obecnością w próbie surfaktantu.

Biorąc powyższe pod uwagę Doktorant postanowił w toku swoich badań przeprowadzić optymalizację i walidację metody ekstrakcji w punkcie zmętnienia w analizie substancji leczniczych w powiązaniu z chromatografią cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (CPE-LC-ESI-MS/MS). Substancjami modelowymi w badaniach były związki z grupy leków sercowo naczyniowych (bisoprolol i antazolina), dla których, jak to wynika z przeglądu literaturowego, nie opracowano dotychczas metody CPE przy ich oznaczaniu. W związku z możliwością wystąpienia efektu matrycowego, mogącego wpływać na wynik oznaczeń, postanowił przebadać jego oddziaływanie w trakcie ich analizy.

W przeprowadzonych badaniach, jako surfaktantu użyto Tritonu X-114, emulgatora o niskiej temperaturze zmętnienia i dużej gęstości, co ułatwiało rozdział fazy micelarnej i wodnej. W trakcie opracowywania metody Doktorant dokonał optymalizacji warunków jej prowadzenia poprzez ustalenie najkorzystniejszej temperatury ekstrakcji, stężenia stosowanego surfaktantu i roztworu NaOH, zapewniających uzyskanie najmocniejszego sygnału chromatograficznego. Wzorcem wewnętrznym przy oznaczeniach bisoprololu był metoprolol, a w przypadku antazoliny ksylometazolina. W walidacji metody brano pod uwagę precyzję, dokładność, efekt matrycowy oraz stabilność oznaczanych związków w materiale biologicznym i ekstrakcie. Uzyskane wyniki spełniały kryteria walidacyjne EMA oraz FDA..

Dodatkowo wyniki badań walidacyjnych w przypadku bisoprololu Doktorant porównał z wynikami walidacyjnymi, otrzymanymi dla metody z zastosowaniem ekstrakcji ciecz-ciecz, opracowanej w Instytucie Farmaceutycznym. Wykazał wysoką korelację zachodzącą między oznaczeniami uzyskiwanymi jedną i drugą metodą ($r=0,98$). Pozwoliło mu to na wyciągnięcie wniosku, że obie metody należy traktować, jako równorzędne oraz, że proponowana technika oznaczania może być stosowana do oceny stężeń bisoprololu w osoczu.

Również przy ocenie oznaczeń antazoliny Doktorant przeprowadził porównanie wyników uzyskiwanych metodą CPE i LLE wykazując ich wysoką korelację ($r=0,99$). Dodatkowo w tym przypadku dokonał również analizy efektu

matrycowego pod kątem wiarygodności uzyskanych wyników. Wykazał, że efekt matrycowy nie był istotnym czynnikiem wpływającym na wiarygodność jej oznaczeń.

W trakcie prowadzonych, w ramach doktoratu badań, Doktorant przeprowadził również analizę wpływu efektu matrycowego na wyniki oznaczeń stężeń w osoczu, metodą CPE, 73 substancji leczniczych z różnych grup klasyfikacji anatomiczno-terapeutyczno-chemicznej. Stosując różne warunki analizy (stężenie surfaktantu, stosowana temperatura, odczyn) ocenił wpływ efektu matrycowego na wyniki oznaczeń ich stężenia. Oceniając rezultaty tych badań wprowadził pojęcie efektu matrycowego zależnego od surfaktantu w odróżnieniu od efektu matrycowego związanego ze składem badanego osocza.

Stosując metodę opartą na analizie głównych składowych ekstrakcji w punkcie zmętnienia oraz metodę drzew klasyfikacyjnych zaproponował sposób przyspieszenia optymalizacji metody CPE i wyselekcjonowania związków podatnych na powstanie efektu magnetycznego. W wyniku przeprowadzonych badań przesiewowych stwierdził, zgodnie z oczekiwaniem, że wśród 73 związków, w przypadku 14% badanych substancji obserwowano wystąpienie znaczącego sygnału matrycowego związanego z surfaktantem, a w przypadku 25% związków stwierdzono wystąpienie absolutnego efektu matrycowego (związanego z dodanym surfaktantem i składem osocza).

Analizując wyniki otrzymane przez Doktoranta w ramach prowadzonych badań i przedstawione w postaci czterech publikacji należy zgodzić się z Jego wnioskiem, że proponowana przez Niego metoda oznaczeń związków leczniczych, poprzez ekstrakcję w punkcie zmętnienia, może być alternatywną, dla wielu leków, w stosunku do obecnie najszerzej stosowanej metody ekstrakcji ciecz-ciecz. Jest ona również prosta i szybka, a dodatkowo ogranicza stosowanie toksycznych rozpuszczalników organicznych.

Podnoszony, w stosunku do niej przez niektórych autorów, zarzut znaczącego wpływu efektu matrycowego pochodzącego od stosowanego w niej surfaktantu, w świetle wyników Doktoranta, może w istotny sposób być zniwelowany, przez stosowanie odpowiednich warunków analizy. Dodatkowo, stosując zaproponowaną przez niego optymalizację metody CPE, możliwe jest wytypowanie związków, dla których metoda ta jest nieodpowiednia. Prowadzi to do wniosku, że w ich przypadku powinno się stosować metodę ekstrakcji ciecz-ciecz.

Oceniając zastosowane metody analityczne, sposoby ich walidacji i wyciągnięte wnioski należy uznać, że są one prawidłowe, a ich interpretacja nie budzi zastrzeżeń.

Otrzymane wyniki badań przedstawione w poszczególnych publikacjach są dobrze udokumentowane licznymi tabelami i wykresami. Dowodzą one dużej dbałości Autorów o stronę redakcyjną.

Pewne zdziwienie wzbudził we mnie dość niski procentowy udział Doktoranta w trzech z czterech załączonych do doktoratu publikacjach, wynoszący średnio 20% (nawet w publikacji, w której jest On pierwszym autorem). Rozumiem jednak, że wiodącą rolą w nich był udział Autora, pełniącego jednocześnie rolę promotora pomocniczego. Załączona dokumentacja nie wyjaśnia na czym polegał udział poszczególnych autorów.

Biorąc jednak pod uwagę zrealizowanie celów, które postawił przed sobą Doktorant, poprawność przeprowadzonych badań i stosowanych metod, jak również otrzymane wyniki, pozytywnie oceniam przedstawioną do recenzji pracę. Warta podkreślenia jest aplikacyjność prowadzonych badań, które mogą doprowadzić do stosowania na większą skalę metody ekstrakcji w punkcie zmętnienia do oznaczania związków leczniczych w trakcie prowadzenia terapii monitorowanej stężeniem związków czynnych.

W związku z powyższym proponuję Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego dopuszczenie Pana mgr Grzegorza Kojro do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Janusz Pluta

Wrocław, 16 grudnia 2019 roku