



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W  
POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD FARMACJI FIZYCZNEJ I FARMAKOKINETYKI

Adres: ul. Święcickiego 6.  
60-781 Poznań  
mkaraz@ump.edu.pl

tel 0-618546432  
fax 0-618546430

---

Poznań 2019-11-17

#### RECENZJA

pracy doktorskiej wykonanej przez mgr farmacji Grzegorza Kojro

pt: „Wykorzystanie ekstrakcji w punkcie zmętnienia do oznaczania wybranych substancji sercowo-naczyniowych w osoczu metodą chromatografii cieczowej powiązanej ze spektrometrią mas”

Wybór odpowiedniej metody izolacji substancji leczniczej i/lub jej metabolitów z próbek biologicznych pobranych od pacjenta odgrywa kluczową rolę w terapii monitorowanej stężeniem leku we krwi oraz w badaniach farmakokinetycznych. Jest to związane z koniecznością dokładnego i precyzyjnego oznaczenia stężeń wyizolowanych analitów, co w konsekwencji ma wpływ na dalszą farmakoterapię. Obecnie wybór odpowiedniej metody izolacji substancji leczniczych z materiału biologicznego uzależniony jest nie tylko od właściwości fizykochemicznych izolowanych związków, lecz także od prostej procedury, niskich kosztów oraz przyjazności dla środowiska. Praca doktorska mgr Grzegorza Kojro wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Wroczyńskiego w Zakładzie Bioanalizy i Analizy Leków Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, wpisuje się doskonale w nowoczesny nurt badań mających na celu zastosowanie bioanalizy do indywidualizacji farmakoterapii u pacjenta, przy jednoczesnym zmniejszeniu kosztów oznaczeń i szkodliwego wpływu na środowisko.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska liczy 35 numerowanych stron i zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, teoretyczne wprowadzenie do badanej tematyki oraz artykuły będące integralną częścią rozprawy wraz z komentarzem. Wyniki przeprowadzonych badań udokumentowano w

czterech spójnych tematycznie publikacjach, wśród których jedna ma charakter pracy poglądowej, a trzy to prace oryginalne opublikowane w międzynarodowych czasopismach, posiadających wysoki współczynnik oddziaływania *Impact Factor* > 3. Elementem łączącym wszystkie publikacje jest zastosowanie ekstrakcji w punkcie zmętnienia do oznaczania substancji leczniczych w materiale biologicznym. Do rozprawy dołączono oświadczenia Doktoranta oraz współautorów opublikowanych manuskryptów. Wynika z nich, że udział p. mgr Grzegorza Kojro w przygotowaniu tych prac był znaczący i wynosił 15 – 85%. Szkoda tylko, że nie opisano dokładnie jaki był zakres pracy włożonej przez każdego z współautorów w prezentowane badania i przygotowane na ich podstawie manuskrypty. Na końcu rozprawy dołączono również informację o udziale Doktoranta w dwóch konferencjach.

Rozdział pierwszy zatytułowany „Wstęp” zawiera teoretyczne wprowadzenie w podjętą tematykę badawczą. W rozdziale tym Doktorant przedstawił zagadnienia dotyczące terapii monitorowanej stężeniem leku we krwi (TDM) z uwzględnieniem czynników determinujących możliwość jej zastosowania. Zwrócił uwagę na kluczowy etap TDM, którym jest pomiar stężenia substancji leczniczej z wykorzystaniem odpowiedniej metody analitycznej. Opisał techniki przygotowania próbki do analizy, ich zalety i wady. Szczególną uwagę zwrócił na ekstrakcję w punkcie zmętnienia (CPE) i możliwość jej zastosowania w sprzężeniu z techniką LC-MS/MS do oznaczania substancji leczniczych w materiale biologicznym. Doktorant trafnie wykorzystał przedstawione powyżej zagadnienia teoretyczne do podkreślenia zasadności przeprowadzonych w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej badań.

Cele pracy zostały jasno sprecyzowane w kolejnym rozdziale i obejmowały przegląd piśmiennictwa dotyczącego stosowanej w badaniach metody ekstrakcji, optymalizację i walidację metody CPE-LC-ESI-MS/MS oznaczania wybranych leków sercowo-naczyniowych w osoczu ludzkim oraz ocenę efektu matrycowego 73 substancji leczniczych o różnych właściwościach fizyko-chemicznych.

Rozdział trzeci zawiera omówienie metodyki badań stosowanej w poszczególnych etapach pracy z uwzględnieniem badanych substancji leczniczych, materiału biologicznego użytego w badaniach oraz warunków analizy chromatograficznej. Szczegółowo opisano metodykę przygotowania próbek do badań przesiewowych efektu matrycowego, schemat oznaczeń oraz warunki chromatograficzne. W Tabeli 2 przedstawiono przebieg elucji gradientowej z zastosowaniem faz A i B, jednak nie opisano składu tych faz. W kolejnym rozdziale omówiono wyniki przeprowadzonych badań. Wg mnie niepotrzebnie prace objęte rozprawą doktorską opisano w dwóch

odrębnych rozdziałach (3 i 4), rozdzielając część metodyczną od wyników badań. Tym bardziej, że w rozdziale czwartym, w opisie poszczególnych publikacji, powtórzono część szczegółów dotyczących metodyki oznaczeń. Ponadto, umieszczono wiele informacji teoretycznych, które mogłyby znaleźć się we wstępie,

Pierwsza praca ujęta w rozprawie doktorskiej to publikacja pogładowa, w której Doktorant przedstawił wyniki przeglądu piśmiennictwa dotyczącego metod ekstrakcji substancji leczniczych z materiału biologicznego. Praca ta stanowi bogate kompendium wiedzy na temat różnorodnych technik przygotowania próbek przed analizą. Dowodzi również tego, że CPE zyskuje coraz większą popularność i uznanie w bioanalizie substancji leczniczych. Kolejne dwie prace to publikacje oryginalne, dotyczące opracowania metod CPE-LC-ESI-MS/MS oznaczania bisoprololu i antazoliny w osoczu ludzkim. W pracach tych omówiono wyznaczone dla tych metod parametry walidacyjne, dokonano także porównania uzyskanych wyników z wynikami otrzymanymi techniką klasycznej ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE) i udowodniono, że CPE może być stosowana równorzędnie z tradycyjną techniką. Wg mnie największym osiągnięciem Doktoranta jest publikacja czwarta, która stanowi zręczne połączenie bioanalizy z technikami chemometrycznymi. Analizując wyniki oznaczeń 73 substancji czynnych, Doktorant wykazał, że w większości przypadków CPE w połączeniu z LC-ESI-MS/MS nie wywoływała wysokiego efektu matrycowego zależnego od surfaktanta, co wcześniej sugerowano w doniesieniach literaturowych. Wskazał na czynniki wpływające na wielkość tego efektu, oraz na użyteczność w procesie optymalizacji ekstrakcji drzew decyzyjnych wykorzystujących deskryptory molekularne analitu. Wprowadził też nowy termin „efekt matrycowy zależny od surfaktantu”, który może być przydatny do rozróżnienia wpływu surfaktantu na wielkość tego efektu.

W rozprawie zamieszczono także podsumowanie, główne osiągnięcia oraz wnioski sformułowane na podstawie uzyskanych wyników, które trafnie podsumowują przeprowadzone badania. Wynika z nich, że ekstrakcja w punkcie zmętnienia może być z powodzeniem stosowana w przygotowaniu próbek do oznaczeń wielu substancji leczniczych metodą LC-ESI-MS/MS, gdyż nie generuje wysokiego efektu matrycowego, jest prosta i szybka, a ponadto przyjazna dla środowiska poprzez mniejsze zużycie rozpuszczalników organicznych. Uzyskane wyniki wpisują się w najnowszy trend „zielonej chemii” i charakteryzuje je duży potencjał aplikacyjny.

Do rozprawy dołączono bibliografię, obejmującą 23 pozycje, głównie w postaci publikacji zagranicznych z kilku ostatnich lat i źródeł internetowych, które zostały dobrze dobrane i w sposób wyczerpujący wyjaśniają podstawy teoretyczne podjętych badań.

Praca napisana jest poprawnie pod względem stylistycznym i gramatycznym. Zastosowane metody badawcze są nowoczesne i zostały trafnie dobrane do rodzaju zadań badawczych i wyznaczonego celu. Wyniki badań przedstawiono w rozprawie oraz w publikacjach nią objętych w postaci przejrzystych tabel i rycin. Zostały one poprawnie zinterpretowane i skomentowane w odniesieniu do danych literaturowych.

Po zapoznaniu się z przedstawioną do recenzji rozprawą, nasunęły mi się dodatkowe uwagi i sugestie:

1. Badania przesiewowe efektu matrycowego przeprowadzone przez Doktoranta obejmują szeroki zakres 73 substancji leczniczych. Niestety nie ma wśród nich leków, dla których standardowo prowadzi się monitorowanie stężeniem we krwi (np. leki immunosupresyjne, aminoglikozydy, kwas walproinowy). Objęcie tych leków badaniem byłoby zasadne w kontekście oceny możliwości zastosowania ekstrakcji w punkcie zmętnienia do oznaczania substancji leczniczych w ramach terapii monitorowanej stężeniem leku, do której Doktorant nawiązuje we wstępie rozprawy.
2. Porównanie metod analitycznych ESI-LC-MS/MS z wykorzystaniem dwóch różnych technik ekstrakcji: LLE i CPE, przeprowadzono zgodnie z wytycznymi EMA dotyczącymi tzw. walidacji krzyżowej (cross-validation). Dodatkowo, korelację między wynikami oceniano na podstawie współczynnika  $r$  Pearsona. Należy mieć świadomość, że współczynnik ten nie jest najlepszym wyznacznikiem równoważności dwóch metod analitycznych. Bardziej użytecznym narzędziem jest przeznaczona do oceny równoważności metod analiza Bland-Altmana lub polecana przez FDA metoda ATE/LER (The Allowable Total Error and Limits for Erroneous Results (ATE/LER) Zones method).

Przedstawione uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, która jest ambitna i nowatorska, a zawarte w niej dane i sposób analizy świadczą o dużej wiedzy i umiejętnościach Doktoranta, nie tylko w zakresie prowadzenia badań bioanalitycznych, ale także analizy uzyskanych wyników z użyciem zaawansowanych technik chemometrycznych.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że recenzowana praca jest oryginalna i dostarcza wielu wartościowych danych dotyczących możliwości zastosowania CPE w połączeniu z LC-MS/MS do analizy szerokiej gamy substancji leczniczych w materiale biologicznym. Stanowi ona twórczy wkład Doktoranta w rozwój nowoczesnych metod

bioanalitycznych z zastosowaniem przyjaznych dla środowiska technik przygotowania próbek jako użytecznych narzędzi do indywidualizacji farmakoterapii. Rozprawa doktorska spełnia kryteria określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami). W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie mgr Grzegorza Kojro do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo, proponuję wyróżnić przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską ze względu na wysoki aplikacyjny charakter uzyskanych wyników. O ich wartości świadczy również fakt, że zostały opublikowane w 3 specjalistycznych czasopismach z bazy JCR o sumarycznym współczynniku oddziaływania  $IF= 11,039$  i w jednej publikacji przyjętej do druku.

dr hab. n. farm.  
*M. Karażniewicz-Łada*  
M. Karażniewicz-Łada

