

Warszawa, 31.01.2019 r.

dr hab. Arkadiusz Szterk, prof. NIL

Z-ca Dyrektora ds. Naukowych

Kierownik merytoryczny

Zakładu Metod Spektrometrycznych

Narodowy Instytut Leków w Warszawie

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marty Zezuli pt. „Opracowanie metod określania profilu zanieczyszczeń wybranych prostaglandyn”

Wykonanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Katarzyny Koziak
oraz promotora pomocniczego dr hab. Wioletty Maruszak, prof. IF
w Zakładzie Analityki Badawczej w Instytucie Farmaceutycznym w Warszawie

Prostaglandyny stanowią grupę aktywnych biologicznie substancji hormonalnych. Wpływają one na przebieg różnorodnych procesów biologicznych, w tym nasilenie odpowiedzi zapalnej, kurczliwość mięśni gładkich, agregację płytek krwi, różnicowanie adipocytów, a także przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej. Prostaglandyny - analogi PGF_{2α} - znalazły zastosowanie w medycynie, w leczeniu jaskry, poprzez efektywne zmniejszanie ciśnienia wewnątrzgałkowego. O skuteczności terapii decyduje wiele czynników, w tym jakość zastosowanego produktu leczniczego. Jednym z jej aspektów z kolei jest jakość chemiczna rozumiana również jako czystość chemiczna. Synteza substancji aktywnych, stosowanych przy wytwarzaniu produktów leczniczych, w tym przypadku analogów PGF_{2α}, stanowi najważniejszy etap ich produkcji. W celu wyprodukowania wysokiej jakości substancji aktywnej wręcz niezbędna jest kontrola procesu z punktu widzenia chemii analitycznej. Ze względu na złożoność procesu syntezy różnych prostaglandyn i możliwość powstawania wielu izomerów konfiguracyjnych, opracowywanie bardzo selektywnych i sprawnych metod rozdziału, jest niezwykle istotne. Umożliwia to bowiem wykrywanie i identyfikację potencjalnych zanieczyszczeń, które standardowymi

metodami badawczymi mogą lub nie są wykrywane i przedostają się do produktów leczniczych, stanowiąc potencjalne zagrożenie dla zdrowia pacjentów. W świetle powyższego dysertacja Pani mgr inż. Marty Zezuli zbiega się z aktualnymi trendami badawczymi, co czyni ją w pełni zasadną.

Przedstawiona do oceny praca jest typowym opracowaniem o charakterze eksperymentalnym i obejmuje 139 stron, w tym 69 rysunków oraz 57 tabel. Struktura i podział części pracy są prawidłowe: część literaturowa zajmuje 30 stron, cel pracy – 1 stronę, opis materiałów i metod badawczych – 7 stron, a pozostałą część zajmuje omówienie i dyskusja wyników oraz podsumowanie i wnioski (łącznie 93 strony). Spis literatury obejmuje 8 stron.

W bardzo rzeczowej części teoretycznej Autorka wprowadza czytelnika w zagadnienie i uzasadnienie wyboru tematu oraz celu badań. Przegląd literatury wyjątkowo dobrze opisuje przeciwwjaskrowe nowe analogi prostaglandyny PGF_{2α}. Autorka szczegółowo charakteryzuje je z punktu widzenia skuteczności terapeutycznej oraz efektów ubocznych. W sposób przejrzysty opisane zostały drogi syntezy różnych analogów PGF_{2α}, z zaznaczeniem jak ważna jest kontrola procesu syntezy z punktu widzenia powstawania niepożądanych produktów reakcji, mogących w efekcie końcowym przedostawać się do substancji aktywnej i produktu leczniczego. Autorka podkreśla znaczenie chemii analitycznej w kontroli jakości produktów leczniczych już na samym początku, czyli od wyjściowych substratów stosowanych w procesie syntezy. Dokonuje również dość gruntownego przeglądu piśmiennictwa z zakresu oznaczania analogów PGF_{2α} w produktach leczniczych i kosmetykach oraz oznaczania zanieczyszczeń substancji aktywnej. Dużą część przeglądu piśmiennictwa zajmuje opis etapów opracowywania i walidacji metod chromatograficznych. Przedstawione w tej części treści, ściśle wiążą się z realizowanym zakresem problemu badawczego i uzasadniają sformułowanie celu pracy oraz przyjęte postępowanie w kolejnych zadaniach podczas realizacji doświadczeń. Autorka posługuje się w tej części bardzo dobrze wykonanym przeglądem literatury, głównie zagranicznej, o charakterze źródłowym. Dobór pozycji piśmiennictwa i ich wykorzystanie, nie tylko w części teoretycznej, ale także przy omawianiu uzyskanych wyników, świadczą o umiejętności korzystania przez Autorkę z dostępnej literatury i o bardzo dobrym rozeznaniu w badanej problematyce. Część teoretyczna została napisana dość starannie. Niemniej jednak zauważono niewielkie omyłki

pisarskie np. na stronie 8, ostatni wiersz w tabeli: „Kolumna Clipeus **Penyl**”, a powinno być: „Kolumna Clipeus **Phenyl**”. Oczywiście tego rodzaju drobne błędy nie ujmują wartości merytorycznej pracy.

Na podstawie wstępu teoretycznego Autorka sformułowała cel pracy. Zarówno główny cel, jak i cele szczegółowe pracy, są bardzo ambitne. Zakres zadań badawczych został określony prawidłowo. Rozbudowany do 4 zadań zakres doświadczeń przedstawiono przejrzysto w kolejnych rozdziałach dysertacji i ma on odzwierciedlenie w zaproponowanej metodyce badawczej. Opis w zakresie materiałów i metodyki badawczej także sformułowano bardzo klarownie i zrozumiale.

Odnosząc się do wyników i ich dyskusji stwierdzam, iż Autorka wykonała bardzo dużo pracy w zakresie doboru najwłaściwszych kolumn chromatograficznych, odpowiednich do efektywnego rozdzielania prostaglandyn, oraz zanieczyszczeń technologicznych i degradacyjnych. Wyraźnie włożyła dużo trudu w dobór składu fazy ruchomej oraz dokonała identyfikacji nowych zanieczyszczeń substancji aktywnej. Nie mniej jednak mam kilka pytań do tej części rozprawy. Uwagę zwracają prezentowane rysunki widm mas badanych analogów prostaglandyn oraz ich zanieczyszczeń technologicznych i degradacyjnych. Przykładowo na rysunku V.1.3.1 Autorka zamieściła widma fragmentacyjne różnych zanieczyszczeń. Wyjaśnienia wymaga jednak fakt, dlaczego na tym rysunku oraz innych podobnych rysunkach zamieszczonych w pracy, widoczne są masy powyżej tej poddawanej fragmentacji. Zgodnie z opisem zawartym w pracy widma fragmentacyjne otrzymywane są w wyniku fragmentacji następujących jonów: 695, 581 oraz 467 (rys. V.1.3.1). Powyżej tych mas, jeśli poprawnie działają analizatory kwadropolowe oraz poprawnie zostały dobrane parametry pracy spektrometru nie powinny być widoczne żadne masy, a szczególnie o tak dużych intensywnościach, jakie widoczne są na przytoczonym rysunku. Drugie pytanie odnosi się do interpretacji jonów pseudo molekularnych. Objaśnienia wymaga mechanizm jonizacji przez elektrorozpylanie, która stosowana była przy wszystkich eksperymentach związanych z badaniem struktury chemicznej. Dodatkowo nasuwa się potrzeba wyjaśnienia mechanizmu powstawania adduktów sodowych i potasowych w trakcie jonizacji miękkiej (chodzi o ESI+). Autorka bardzo często opisuje powstawanie jonów pseudo molekularnych w postaci adduktów sodowych i potasowych, jednakże często dokonuje błędnej interpretacji zarejestrowanych widm mas. Ograniczę się do wskazania tylko jednego niedociągnięcia.

Przykładowo na tym samym rysunku Autorka obserwuje jon pseudo molekularny o $m/z = 695$ oraz addukty z Na i K. Jeśli takie addukty faktycznie powstają, to obserwowane masy powinny wynosić odpowiednio $m/z = 717$, a nie 713 oraz $m/z = 734$, a nie 735. Czy Autorka optymalizowała zatem parametry źródła jonów, spektrometru mas oraz czy rejestrowano widma bez fragmentacji w celu identyfikacji jonu pseudo molekularnego? A jeśli tak, to czy podczas prezentacji multimedialnej Autorka mogłaby dodatkowo przedstawić przykładowe takie widma, żeby widoczny był rozkład izotopowy opisywanych w pracy jonów pseudo molekularnych?

Podczas wykonywania pracy Autorka zastosowała do identyfikacji badanych związków, poza spektrometrią mas, również spektrometrię magnetycznego rezonansu jądrowego. Jednakże powoływanie się na wyniki badań NMR, które potwierdzają strukturę badanych związków bez ich prezentacji np. tabelarycznej lub opisowej w tekście, nie jest praktykowane w pracach naukowych. Wyniki wykonanych analiz NMR powinny być dołączone do pracy przynajmniej w formie aneksu, tak, aby możliwe było sprawdzenie, czy interpretacja zarejestrowanych widm jest poprawna oraz czy praca faktycznie została wykonana.

Znaczącą część wyników i ich dyskusji zajmuje dobór odpowiedniej kolumny chromatograficznej oraz warunków rozdziału chromatograficznego (skład fazy ruchomych, temperatura pracy kolumny, przepływ fazy itp.). Bardzo często Autorka bada i porównuje selektywność kolumn chromatograficznych, ale jednocześnie dość często nie prezentuje wyników przeprowadzonych badań (odnosi się to do informacji zawartej np. na stronie 53 i 54). Rozdzielenie substancji na kolumnie następuje na skutek ich zróżnicowanych prędkości migracji. To czy za pomocą danego układu chromatograficznego (faza stacjonarna + faza ruchoma) można spowodować rozdzielenie dwóch substancji, zależy od termodynamicznych właściwości tego układu. Właściwości te można opisać ilościowo posługując się pojęciem **retencji względnej α** , zwanej również **współczynnikiem selektywności**. Ciekawość wzbudza w tym momencie pytanie czy Autorka porównywała opisywane w pracy różne układy, kolumna-faza ruchoma, właśnie tym parametrem, który odnosi się bezpośrednio do opisywanej w pracy selektywności?

W końcowej części pracy Autorka dysertacji sformułowała 2 wnioski, które znajdują odzwierciedlenie w wynikach przeprowadzonych doświadczeń. Świadczą one o pełnym zrealizowaniu celów postawionych w założeniach pracy.

Z redakcyjnego punktu widzenia wysoko oceniam staranność Autorki w opracowaniu przedstawionej dysertacji. Rysunki i tabele zamieszczone w rozdziałach poświęconych omawianiu wyników pozwalają na ich dobrą interpretację. Na podkreślenie zasługuje także aplikacyjny charakter pracy. Opracowane metody rozdziału chromatograficznego prostaglandyn oraz szeregu zanieczyszczeń prawdopodobnie znajdą szerokie zastosowanie praktyczne przy wytwarzaniu substancji aktywnych w Instytucie Farmaceutycznym. Przy tym zaznaczyć należy, iż prace doktorskie, a raczej ich wyniki, w większości przypadków mają charakter badań podstawowych i stosunkowo rzadko dają się tak użytkowo wykorzystać. Bazując zatem na wartości dodanej jaką niesie omawiana dysertacja uważam, że jest to wyróżniająca się praca doktorska, gdyż ukierunkowana od samego początku, na przeniesienie wyników badań do praktyki produkcyjnej.

Rozważając całość ocenianej pracy stwierdzam, że zawiera ona kompleksowe opracowanie eksperymentalne, w wielu elementach nowatorskie i aplikacyjne. Rozprawa naukowa Pani mgr inż. Marty Zezuli pt. „Opracowanie metod określania profilu zanieczyszczeń wybranych prostaglandyn” jest wykonana na wysokim poziomie i w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim. Dlatego przedkładam Radzie Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Marty Zezuli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



