



**Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny  
Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej  
90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116  
tel. +48 42 631-30-91, fax +48 42 631-31-28**



**Prof. dr hab. inż. Joanna Kałużna-Czaplińska**

---

### **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Olejarz**

„Chromatograficzne badania wybranych leków przeciwwirusowych  
w próbkach biologicznych”

wykonanej na Wydziale Chemii, w Katedrze Chemii Środowiska UŁ

Promotorem rozprawy doktorskiej jest:

**dr hab. Grażyna Chwatko, prof. UŁ**

a Promotorem Pomocniczym

**dr Kamila Borowczyk**

### **Wstęp**

W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie i popularność stosowania leków przeciwwirusowych, dzięki którym leczy się choroby wirusowe, ale także wzmacnia odporność organizmu. Jak większość leków, także te działające na wirusy mogą powodować niepożądane działania, szkodliwe dla organizmu, w tym niestrawności, wymioty, uczucie zmęczenia, czy zaburzenia pracy nerek. Dlatego tak ważne jest monitorowanie dawek leków podawanych pacjentom w celu zminimalizowania skutków ubocznych, w tym nefrotoksyczności. Do tego celu mogą być przydatne metody chromatograficzne, dzięki którym będzie można uzyskać informacje dotyczące między innymi: wydalania leków przeciwwirusowych z moczem, bioakumulacji ich w osoczu oraz biodostępności w ślinie.

Tematyka zrealizowana w rozprawie doktorskiej przez mgr Patrycję Olejarz dobrze wpisuje się właśnie w ten obszar badań naukowych. Dotyczy bowiem opracowania i walidacji nowych metod analitycznych z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV-VIS) do oznaczania leków przeciwwirusowych Tenofowiru (TFV) i Entekawiru (ENT) w materiale biologicznym (osocze, mocz, ślina) oraz kreatyniny (Crn) w próbkach moczu i osocza. Leki te znajdują zastosowanie w terapii niedoboru odporności (HIV) i wirusowego zapalenia wątroby typu B (HBV).

Przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki są aktualne, o czym może świadczyć fakt, że mechanizm nefrotoksyczności TFV jest nie do końca wyjaśniony, a w przypadku leku ENT, którego dawka powinna zależeć od czynności nerek pacjenta, słabo poznana jest odpowiedź wirusologiczna.

Dysertacja wpisuje się także w zasady tzw. „zielonej chemii analitycznej”, ponieważ Doktorantka w świadomy sposób ograniczyła, bądź dokonała eliminacji dużych ilości rozpuszczalników organicznych i odpadów laboratoryjnych podczas optymalizacji procedur analitycznych. Pragnę podkreślić już w tym miejscu duży analityczny wkład pracy mgr Patrycji Olejarz związany przede wszystkim z przygotowaniem próbek materiału biologicznego, który jest bardzo problematyczny i często wiąże się z oznaczaniem analitów występujących na bardzo niskich poziomach stężeń.

### **Struktura i treść rozprawy doktorskiej**

Recenzowana praca mgr Patrycji Olejarz napisana jest w formie tradycyjnej, w której wyróżnione zostały następujące części: wprowadzenie, część literaturowa, cel pracy wraz ze wskazaniem w punktach celów szczegółowych, opis badań eksperymentalnych wraz z uzasadnieniem podjętych działań, opis metod badawczych, dyskusja otrzymanych wyników, podsumowanie i wnioski końcowe oraz literatura. Cytowana bibliografia jest dość obszerna i obejmuje blisko 160 pozycji naukowych, głównie zagranicznych. Ponadto, w przedstawionej do recenzji dysertacji znalazł się: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz dorobku naukowego Doktorantki, wykaz skrótów i symboli, którego zamieszczenie zdecydowanie ułatwiło czytanie pracy oraz spis rycin i tabel. Wykaz dorobku naukowego Doktorantki składa się z 7 publikacji naukowych, które ukazały się w dobrych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Wśród nich są

takie czasopisma jak: *Journal of Separation Science* (Wiley, IF= 3,614), *International Journal of Molecular Science* (MDPI, IF= 6,208), *Biomedical Chromatography* (Wiley, IF= 1,911), czy *Analytical Biochemistry* (Elsevier, IF= 3, 219). Ponadto, w dorobku naukowym znajduje się zgłoszenie patentowe. Wyniki Doktorantki były także prezentowane podczas polskich i zagranicznych konferencji naukowych w formie komunikatów ustnych i posterowych.

Wprowadzenie, opis wyników wraz z dyskusją dotyczący otrzymanych przez Doktorantkę rezultatów nie budzą większych moich wątpliwości. Podoba mi się, że Doktorantka przedstawiła w uporządkowany sposób, krok po kroku jak opracowywała procedury analityczne oznaczania analitów dla różnych matryc biologicznych. Przy tak dużej ilości wyników, dla różnych próbek biologicznych bardzo to porządkuje czytanie pracy.

W części wprowadzającej do tematyki badań, znalazły się informacje na temat wirusów HIV i HBV, zaprezentowane zostały terapie przeciwwirusowe zakażeń wirusami HIV i HBV ze wskazaniem leków najczęściej stosowanych w terapii oraz szczegółowe informacje na temat Tenofowiru (TFV) oraz Entekawiru (ENT). Ponadto, znalazła się w części literaturowej charakterystyka biochemicznego markera zaburzeń pracy nerek, jakim jest kreatynina oraz informacje na temat płynów ustrojowych: moczu, krwi i śliny. W bardzo zwarty, tabelaryczny sposób zaprezentowany został przegląd metod oznaczania TFV i ENT w materiale biologicznym. Ta część rozprawy jest dobrym wprowadzeniem do części eksperymentalnej.

Cel główny badań został sformułowany jasno i dotyczył opracowania i walidacji metod analitycznych do oznaczania TFV i ENT oraz kreatyniny w płynach ustrojowych z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną. Oprócz celu głównego w rozprawie znalazły się także zadania badawcze, nazwane przez Doktorantkę celami szczegółowymi w skład których weszły: opracowania nowych metod analitycznych jednoczesnego oznaczania leków i kreatyniny, walidacja opracowanych metod, poprzedzona optymalizacją warunków przygotowania próbek do analiz końcowych oraz uwzględnienie zminimalizowania zużycia odczynników chemicznych, w tym rozpuszczalników organicznych na wszystkich etapach procedur analitycznych.

W części doświadczalnej, dotyczącej opisu prowadzonych eksperymentów, szczególną uwagę zwrócono na dobranie warunków rozdzielania TFV i kreatyniny w moczu, który uwzględniał wybór odpowiedniej kolumny chromatograficznej i analitycznej długości fali, optymalizację rozdzielania chromatograficznego, sprawdzenie stabilności analitów oraz walidację metody. Następnie wykorzystanie metody do oznaczenia poziomów stężeń leku w moczu oraz wyznaczenie profilu farmakokinetycznego. Badania doświadczalne dla TFV i kreatyniny dotyczyły także osocza. Etap tych badań uwzględniał dobranie warunków separacji oraz przygotowanie próbek do analizy z uwzględnieniem etapu odbiałczania z użyciem filtrów membranowych typu „cut off”, które to nie przyniosło oczekiwanego przez Doktorantkę rezultatu. Ponadto, zbadano trwałość TFV i kreatyniny w osoczu krwi człowieka i zwalidowano opracowaną metodę. Doktorantka opracowała i zwalidowała także metodę oznaczania TFV w innym materiale biologicznym, w ślinie. Kolejny trudny etap pracy eksperymentalnej dotyczył oznaczania ENT i kreatyniny w moczu, osoczu i ślinie z uwzględnieniem etapów przygotowania próbek do analizy. Na podkreślenie zasługuje także fakt, że Doktorantka oprócz zastosowania detekcji spektrofotometrycznej, zbadła możliwości zastosowania innego detektora, mianowicie detektora spektrofluorescencyjnego (FLD), który okazał się przydatny tylko dla oznaczeń ENT w próbkach moczu, osocza, śliny. Część doświadczalna wymagała od Doktoranki ogromnego zaangażowania i wielogodzinnej pracy w laboratorium, dlatego ten etap bardzo doceniam, ponieważ wiem jak trudne i żmudne bywa przygotowanie próbek biologicznych do analizy oraz walidacja nowej metody.

## **Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej**

Za najbardziej wartościowe w przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej uważam:

- Opracowanie, zoptymalizowanie prostych procedur analitycznych oznaczania TFV i ENT oraz kreatyniny w moczu, osoczu i ślinie,
- Opracowanie nowej metody jednoczesnego oznaczania i monitorowania poziomów stężeń TFV i kreatyniny w osoczu,
- zbadanie wpływu różnych czynników na proces separacji leków przeciwwirusowych w płynach ustrojowych,
- podjęcie się wyjaśnienia, jak leki i potencjalne dawki mogą wpływać

na neurotoksyczność u pacjentów poprzez zastosowanie wskaźnika - kreatyniny.

### **Uwagi**

Recenzent poza oczywistym podkreśleniem walorów i zalet pracy ma także obowiązek wskazania pewnych niedociągnięć, uwag i postawienia pytań.

Wśród niedociągnięć w pracy, uwag dyskusyjnych, merytorycznych i pytań trzeba wymienić:

1. błędne sformułowania, np. na str. 57 , powinno być: najlepszych rozdzielczości, wąskich pików, używając kolumnę, na str. 61 powinno być: w matrycy nie występują składniki, na str. 72 powinno być: rozdzielczości sygnałów.
2. Czy w zdaniu na str. 56 , 2 akapit, 5 linijka chodzi o jednostki leku?
3. Co rozumie Pani pod pojęciem walidację nowoczesnych metod analitycznych? (str. 49). Wydaje mi się, że miała Pani raczej na myśli nowe metody analityczne.
4. Proszę o rozwinięcie zagadnienia optymalizacji w kontekście zdania ze strony 49, „ *Z uwagi na fakt, iż etap przygotowania próbki do analizy generuje najwięcej błędów, prowadzony przeze mnie proces optymalizacji był determinowany potrzebą minimalizacji liczby etapów przygotowania próbki do końcowej analizy.*”
5. Na stronie 61, znajduje się zapis „jakość separacji”, co ma Pani na myśli ?
6. Czy zamiast zamrażać i rozmrażać materiał biologiczny, np. mocz nie łatwiej byłoby podzielić go na mniejsze porcje przed zamrożeniem, pytam w przypadku próbek rzeczywistych pochodzących od pacjentów? Rozumiem intencje prowadzonych badań pod kątem stabilności analitów na wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie np. dla TFV i brak stosownych informacji literaturowych, które warto uzupełnić.
7. Czym się Pani kierowała przy wyborze detektorów?
8. Czy każdy pacjent z wirusem HBV typu B wymaga leczenia przeciwwirusowego i jego monitorowania?

## **Podsumowanie recenzji**

Stwierdzam, że mgr Patrycja Olejarz wykazała się wiedzą w aktualnej tematyce będącej przedmiotem rozprawy doktorskiej, a wskazane w recenzji uwagi nie umniejszają wartości dysertacji.

Praca spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (aktualne odniesienie do aktu prawnego - tekst jednolity: DzU z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.).

## **Wniosek końcowy**

Podsumowując, recenzowana rozprawa mgr Patrycji Olejarz zatytułowana „*Chromatograficzne badania wybranych leków przeciwwirusowych w próbkach biologicznych*” spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, wnoszę o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Joanna Kasińska-Czaplińska*

Łódź, 5 maj 2023 rok