



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Dr hab. Małgorzata Iciek
Katedra Biochemii Lekarskiej
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
ul. Kopernika 7
30-034 Kraków
tel: +48 12 422 74 00 wew.32
e-mail: malgorzata.iciek@uj.edu.pl

Kraków, 28.04.2023r.

OCENA

**Rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Olejarz
pt. „Chromatograficzne badania wybranych leków przeciwwirusowych
w próbkach biologicznych”**

Badania nad nowymi metodami wykrywania i oznaczania różnych, ważnych z biologicznego punktu widzenia związków organicznych w próbkach biologicznych leżą od wielu lat w kręgu zainteresowań badawczych Katedry Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. W tym celu wykorzystywane są różnorodne nowoczesne techniki separacyjne, wśród których wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) z detekcją UV-VIS lub z detekcją spektrofluorymetryczną zajmują szczególną pozycję ze względu na prostotę i szybkość analizy oraz stosunkowo niskie koszty oznaczeń.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Patrycji Olejarz zatytułowana „Chromatograficzne badania wybranych leków przeciwwirusowych w próbkach biologicznych” wpisuje się zatem w tematykę badań prowadzonych w Katedrze poszerzając je o aspekty związane z oznaczaniem dwóch leków przeciwwirusowych tenofowiru i entekawiru stosowanych w terapii zakażeń wirusami HIV i HBV. Stosowanie tego typu leków hamuje replikację wirusa, ale niestety obarczone jest efektami niepożądanymi, w tym przede wszystkim działaniem nefrotoksycznym. Dlatego też u pacjentów w trakcie leczenia tymi preparatami zaleca się kontrolowanie czynności nerek.

Katedra Biochemii Lekarskiej

31-034 Kraków, ul. Kopernika 7, tel. +48 12 422 74 00, faks +48 12 422 32 72, e-mail: kbl_sekr@em-uj.krakow.pl
www.biochemia.em-uj.krakow.pl

Wychodząc naprzeciw tym zaleceniom, Doktorantka postawiła sobie za cel opracowanie nowoczesnych metod analitycznych umożliwiających oznaczanie w płynach biologicznych człowieka badanych leków, tj. tenofowiru lub entekawiru jednocześnie z oznaczeniem poziomu kreatyniny pozwalającej na ocenę czynności nerek.

Oceniana rozprawa doktorska liczy 178 stron i składa się z dwóch głównych części. W pierwszej części teoretycznej, po krótkim wprowadzeniu w oparciu o dostępną literaturę Autorka przedstawiła ogólne informacje o wirusach HBV i HIV oraz podstawowe metody leczenia zakażeń tymi wirusami ze szczególnym uwzględnieniem dwóch leków będących przedmiotem badań niniejszej rozprawy, czyli tenofowiru i entekawiru. W kolejnych dwóch rozdziałach części teoretycznej Doktorantka przedstawiła kreatyninę jako biochemiczny marker funkcjonowania nerek, a następnie scharakteryzowała płyny biologiczne wykorzystywane do analizy w przedstawianej pracy, czyli mocz, krew (osocze) oraz ślinę. W ostatnim rozdziale części teoretycznej Autorka omówiła opisane do tej pory w literaturze metody chromatograficzne umożliwiające oznaczanie w próbkach biologicznych tenofowiru i entekawiru. Część teoretyczna rozprawy wraz z wprowadzeniem liczy w sumie ok. 39 stron. Po dobrze i wyraźnie sformułowanym głównym celu rozprawy doktorskiej wraz ze sprecyzowaniem celów szczegółowych Autorka przeszła do drugiej części rozprawy, gdzie opisała badania własne. Ta eksperymentalna część rozprawy obejmuje opis stosowanych odczynników, aparatury i materiału do badań oraz szczegółowo przedstawia wyniki otrzymane w toku opracowywania kolejnych procedur oznaczania tenofowiru w ślinie oraz tenofowiru wraz z kreatyniną w moczu i osoczu człowieka, a następnie entekawiru w ślinie oraz entekawiru wraz z kreatyniną w ludzkim moczu i osoczu. Tę część rozprawy kończy 22 – stronicowa dyskusja wyników oraz krótkie podsumowanie i wnioski końcowe. Ta część pracy jest najbardziej rozbudowana, bo liczy w sumie 95 stron. Na końcu rozprawy zamieszczona została bogata bibliografia licząca 157 pozycji literaturowych, a także spis rycin, spis tabel oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Na ostatnich stronach rozprawy Autorka przedstawiła swój dorobek naukowy obejmujący publikacje naukowe, komunikaty konferencyjne, zgłoszenie patentowe, nagrody oraz udział w projektach badawczych.

Leczenie chorych zakażonych wirusami HIV lub HBV powinno być połączone z systematyczną kontrolą stężenia leku w płynach biologicznych, co pozwalałoby na ustalenie odpowiedniej dawki terapeutycznej stosowanych leków. Równocześnie ze względu na niebezpieczeństwo stosowanych leków związane z nefrotoksycznością w trakcie terapii wskazana jest kontrola prawidłowej czynności nerek. Ponadto, u pacjentów z zaburzeniami czynności nerek konieczne jest indywidualne dostosowanie dawki leku. Dlatego też zadanie

podjęte przez Doktorantkę mające na celu opracowanie metod pozwalających na jednoczesne oznaczenie stężenia stosowanego leku oraz stężenia kreatyniny w płynach biologicznych uważam za zasadne i nowatorskie. Warto podkreślić, że opracowane przez Doktorantkę procedury analityczne są pierwszymi chromatograficznymi metodami równoczesnego oznaczania badanych leków i kreatyniny. Na uwagę zasługują także inne cele, które przyświecały Doktorantce w trakcie realizacji pracy doktorskiej, a mianowicie wykorzystanie stosunkowo prostych i tanich, ale efektywnych technik chromatograficznych, a także minimalizacja czasu, zużycia odczynników oraz uproszczenie procedury analitycznej. Warto podkreślić osiągnięcia Doktorantki w aspekcie rozwinięcia badań o rzadko stosowane w tym celu matryce biologiczne, czyli mocz i ślinę. Wykorzystanie tych płynów biologicznych do badań stężeń leków w trakcie terapii zakażeniami wirusowymi znacznie zmniejsza ryzyko zakażenia w stosunku do pobierania próbek krwi, a ponadto pobieranie tych próbek jest nieinwazyjne i możliwe w warunkach domowych.

Po wnikliwej lekturze przedłożonej rozprawy doktorskiej mogę z pewnością stwierdzić, że do najważniejszych osiągnięć Doktorantki w ramach realizacji pracy doktorskiej należy:

- ✓ opracowanie i walidacja metody jednoczesnego oznaczania tenofowiru i kreatyniny w próbkach moczu człowieka
- ✓ opracowanie i walidacja metody jednoczesnego oznaczania tenofowiru i kreatyniny w próbkach osocza ludzkiego
- ✓ opracowanie metody oznaczania tenofowiru w ślinie człowieka
- ✓ opracowanie i walidacja metody jednoczesnego oznaczania entekawiru i kreatyniny w próbkach moczu i osocza człowieka z detekcją spektrofotometryczną
- ✓ opracowanie metody oznaczenia entekawiru z wykorzystaniem detekcji spektrofluorymetrycznej w moczu, osoczu i ślinie człowieka

W celu opracowania wyżej wymienionych metod konieczne było wykonanie w trakcie realizacji pracy doktorskiej ogromnej ilości eksperymentów i analiz, których wyniki Doktorantka przedstawiła na 62 rycinach i 23 tabelach. Pozwoliło to na sformułowanie końcowego wniosku, stwierdzającego, że przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV-VIS możliwe jest jednoczesne oznaczenie stężenia leku przeciwwirusowego (tenofowiru lub entekawiru) i kreatyniny w moczu i osoczu człowieka, co daje możliwość kontroli funkcjonowania nerek i dostosowania odpowiedniej dawki leku. Ponadto, wyniki uzyskane przez Doktorantkę w trakcie realizacji pracy pozwoliły na wyznaczenie profilu farmakokinetycznego badanych leków z jednoczesną normalizacją ich

stężenia względem kreatyniny. Wszystkie opracowane i zoptymalizowane procedury HPLC z detekcją UV, a w przypadku oznaczania entekawiru także z detekcją FLD spełniają odpowiednie kryteria walidacyjne stawiane metodom dedykowanym dla próbek biologicznych. Opracowane i opisane w tej rozprawie przez Autorkę metody analityczne pozwalają również na minimalizację objętości badanej próbki biologicznej w stosunku do innych opisanych w literaturze metod oraz na ograniczenie zużycia rozpuszczalników organicznych, co niewątpliwie ma istotne znaczenie ekonomiczne i ekologiczne. Część wyników uzyskanych przez Doktorantkę w trakcie realizacji pracy doktorskiej została opublikowana w renomowanym czasopiśmie naukowym *Pharmaceuticals*. Ponadto uzyskane wyniki i opracowana metoda równoczesnego oznaczania tenofowiru i kreatyniny w moczu stały się podstawą zgłoszenia patentowego z udziałem Doktorantki.

Zadaniem recenzenta jest nie tylko podkreślenie osiągnięć Doktoranta, lecz także wskazanie niedociągnięć i błędów ocenianej rozprawy doktorskiej. W związku z tym mam kilka uwag do rozprawy, przy czym są to uwagi głównie natury edytorskiej.

Myślę, że w spisie treści, który jest na początku rozprawy, warto byłoby zamieścić pełne nazwy zamiast skrótów TFV, ENT, czy Crn. W spisie treści w pkt 8 zawarta jest informacja, że oznaczenie TFV i Crn wykonywano w osoczu krwi człowieka, podczas gdy w innych pkt. 7, czy 9 podano ogólnie, że oznaczenia wykonywano w moczu lub ślinie nie uściślając, że próbki te pochodziły od człowieka. W tytułach pkt. 9 i 10 podano dokładnie z jaką detekcją (spektrofotometryczną lub spektrofluorymetryczną) oznaczano entekawir. Przez analogię, w pkt. 7 i 8 można było również dodać sposób detekcji tenofowiru i kreatyniny.

W wykazie skrótów zamiast „aminotransfereaza asparaginianowa” powinno być „aminotransferaza asparaginianowa”. We wprowadzeniu na str. 9 zamiast „kreatyniny” powinien być skrót Crn wprowadzony już wcześniej na str. 8.

Na str. 19-20 zamieszczono wzory dwóch stosowanych proleków tenofowiru, czyli TDF i TAF. Zabrakło mi graficznego przedstawienia samej aktywnej formy tenofowiru, czyli jego difosforanu. Można też było na jednym rysunku przedstawić przekształcenie proleków w aktywną formę.

W rozdziale 2.2 Autorka przedstawiła informacje ogólne na temat tenofowiru i jego form podawanych jako proleki, tj. TDF i TAF. Nie jest do końca dla mnie jasne, czy pisząc o przypadkach nefrotoksyczności wywołanej przez tenofovir, Autorka miała na myśli sam tenofovir, czy formę tego leku, która jest podawana pacjentowi, czyli TDF. Podawanie innej

formy proleku, czyli TAF, jak pisze Doktorantka prowadziło do zmniejszenia nefrotoksyczności. Czy wynikało to ze zmniejszenia stężenia tenofowiru, czy też z faktu, że TDF jest bardziej nefrotoksyczny niż TAF?

Z rozdz. 2.2 wynika, że TAF jest efektywniejszym prolekiem tenofowiru niż TDF, ponieważ umożliwia leczenie mniejszymi dawkami i wykazuje mniejszą nefrotoksyczność. Dlatego też nie jest dla mnie jasne, dlaczego TDF, a nie TAF powinien być stosowany jako lek pierwszorazowy spośród analogów nukleotydowych (str. 21).

Na str. 27 Autorka wymienia prawidłowe składniki ludzkiego moczu zaliczając do nich cukry. Glukoza jest wymieniana jako składnik suchej masy moczu, ale w warunkach prawidłowych glukoza jest prawie w całości reabsorbowana z moczem pierwotnym i wydalana w ilościach śladowych niewykrywanych w rutynowym badaniu moczu. Dopiero gdy stężenie glukozy w osoczu przekracza wartość 180 mg/dL (próg nerkowy), w wydalonym moczku pojawia się glukoza w większej, wykrywalnej ilości, co świadczy o patologii. To wyjaśnienie przydałoby się w tekście, ponieważ obecna wersja sugeruje obecność w moczku prawidłowym wykrywalnych ilości glukozy. Ponadto, wśród składników moczu znajduje się raczej urobilinogen, a nie urobilina. W opisie składników moczu zabrakło mi oprócz mocznika innych związków azotowych, np. małych ilości amoniaku, kwasu moczowego, a przede wszystkim kreatyniny, zwłaszcza że jest ona oznaczana przez Doktorantkę m.in. w moczku.

W rozdziale 6 Autorka pisze, że próbki moczu lub śliny były analizowane od razu po dostarczeniu do laboratorium lub zamrażane i analizowane później. Sugeruje to, że część oznaczeń była wykonywana w świeżym moczku bądź ślinie, a część w materiale po rozmrożeniu. Czy Doktorantka zauważyła jakieś różnice w wynikach w zależności od czasu analizy? Wyniki przedstawione na str. 64 na Ryc. 14 wyraźnie wskazują, że pierwsze rozmrożenie próbek moczu wywołało spadek zawartości TFV o 5,6%, a w ślinie o 6,2%. Wydaje się więc, że kwestia analizy świeżego materiału lub po jego rozmrożeniu nie jest dowolna. Mam wątpliwości, czy informacja o analizowaniu próbek moczu i śliny bezpośrednio od razu po dostarczeniu do laboratorium lub analizowaniu później po rozmrożeniu oznacza dowolność czasu analizy, czy może dotyczy oznaczania stabilności próbki, którą przedstawiono na Ryc. 14. Z opisu przedstawionego na str. 54 wynika, że w przypadku osocza wszystkie próbki były mrożone. Czym było podyktowane takie podejście? Czy nie lepiej było ujednoczyć wszystkie procedury, np. wszystkie próbki mrozić i analizować po rozmrożeniu?

W metodyce na str. 54 napisano, że część próbek moczu pochodziła od pacjentów z WZWB zażywających tenofovir w postaci tabletek Viread. W odniesieniu do wstępu,

w którym Autorka dokładnie opisała dwie formy stosowanego proleku tenofowiru, brakuje tu informacji jaką formą proleku jest Viread. Informacja ta pojawia się wprawdzie później w wynikach na str. 68 w podrozdziale 7.5, jednak powinna być podana już wcześniej, czyli w metodyce.

Szkoda, że Doktorantce nie udało się przeprowadzić analizy farmakokinetycznej na większej liczbie pacjentów leczonych tenofowirem, co umożliwiłoby zaprezentowanie danych statystycznych, jednak rozumiem, że znalezienie takich pacjentów oraz pozyskanie od nich materiału, np. moczu w kilku interwałach czasowych po zażyciu leku jest niezwykle trudne. Tym bardziej warte jest docenienie starań i pracy Doktorantki w tym zakresie i podkreślenie faktu zweryfikowania proponowanej procedury analitycznej na materiale pochodzącym od pacjentów leczonych preparatem Viread.

Proszę także o wyjaśnienie, dlaczego w przypadku entekawiru w detekcji spektrofotometrycznej nie wykonano badań stabilności analitu w badanym płynie (moczu, ślinie, osoczu) po kolejnych cyklach mrożenia analogicznie jak w przypadku tenofowiru.

Czy nie udało się pozyskać żadnych pacjentów leczonych entekawirem, aby podobnie jak dla tenofowiru zaprezentować użyteczność opracowanej metody do badania stężenia leku w moczu?

Przy czytaniu pracy zauważyłam kilkanaście błędów literowych lub innych drobnych niedociągnięć, których listę przedstawiam poniżej:

Str. 8 ostatni akapit – „liczba” zamiast „liczbę”

Str. 19 w podpisie rysunku odwrócona kolejność w nazwie

Str. 20 powinien być skrót TFN, zamiast pełnej nazwy

Str. 21 „nukleotydydowych” zamiast „nukleotydowych”

Str. 30 Tabela – kolumna opisana jako komórki (mm³) lepiej byłoby opisać jako ilość/liczba komórek

Str. 29 „dezoksyhemoglobina” zamiast „deoksyhemoglobina”

Str. 38 „praca” zamiast „pracę”

Str. 54 „przeprowadzono” zamiast „przeprowadzona”

Str. 58 „zmniejszyć” zamiast „zmniejszenia”

Str. 62 „10-ktornie” zamiast 10-krotnie”

Na Ryc. 23 proponowałabym przedstawienie wyników w odwrotnej kolejności, analogicznie jak na innych rycinach, tj. A) TFV, a B) Crn

Str. 83 „puncie” zamiast „punkcie”

Str. 83 „a poziomie” zamiast „na poziomie”

Str. 83 „wynosił” zamiast „wynosiła”

Str. 88 „ETN” zamiast „ENT”

Str. 88 „pochodzącymi” zamiast „pochodzących”

Str. 89 „gradientowy” zamiast „gradientowych”

Str. 90 „składnia” zamiast „składnika”

Str. 90 na Ryc. 36B w opisie osi „EN” zamiast „ENT”

Str. 118 „do mocz” zamiast „do moczu”
Str. 127 „ZOBRAx” zamiast „ZORBAX”
Str. 137 dwukrotnie powtórzone słowa „temperaturach, temperaturze”
Str. 137 „potwierdzaj” zamiast „potwierdzają”
Str. 138 ostatnie zdanie przed rozdz. 12.2.– brakuje określenia „badań zależności między stężeniem leku, a czym...”
Str. 139 „wynosi” zamiast „wynoszą”
Str. 141 „umożliwi” zamiast „umożliwiającego”
Str. 142 „zaprezentowane” zamiast „zaprezentowano”
Str. 143 „szerokim” zamiast „szerokie”
Str. 144 ‘rozwińnięcie metody separacji i identyfikacji ENT w próbkach osocza i śliny’ – brakuje określenia „z wykorzystaniem detekcji FLD”
Str. 149 „może” zamiast „mogą”

Biorąc pod uwagę obszerność rozprawy doktorskiej taka ilość drobnych błędów edytorskich jest dopuszczalna i w żaden sposób nie umniejsza wysokiemu poziomowi pracy.

Podsumowując, mimo moich uwag przedstawionych z obowiązku recenzenta, rozprawę doktorską Pani magister Patrycji Olejarz oceniam pozytywnie. Praca ma charakter nowatorski, przeprowadzone badania zostały dobrze zaplanowane i bardzo starannie wykonane, a cel wyznaczony przez Doktorantkę został zrealizowany.

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Patrycji Olejarz zatytułowana „Chromatograficzne badania wybranych leków przeciwwirusowych w próbkach biologicznych” spełnia wszystkie warunki wymagane dla pracy doktorskiej i określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 65 poz. 695 z późn. zm.). Dlatego też zwracam się z wnioskiem o dopuszczenie mgr Patrycji Olejarz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Melgomska Julia

Kraków, 28 kwietnia 2023r.