



prof. dr hab. n. farm. Ireneusz Sowa

UNIwersytet Medyczny w Lublinie

Katedra Chemii, Zakład Chemii Analitycznej

ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin, tel. (81) 448-71-80, fax (81) 448-71-81

Lublin, dn. 20.05.2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Wanat

*pt. " Dane chromatograficzne i właściwości fizykochemiczne w prognozowaniu
zdolności przenikania leków i innych związków chemicznych do mleka matki"*

Praca została wykonana w Zakładzie Chemii Analitycznej Katedry Chemii Medycznej

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Promotor rozprawy: prof. dr hab. n. farm. Elżbieta Brzezińska

Promotor pomocniczy: dr hab. n. farm. Anna Sobańska

Recenzja została wykonana na wniosek Dziekana Wydziału Farmaceutycznego i Przewodniczącej Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi Pani prof. dr hab. Anny Kilanowicz-Sapoty.

Farmakoterapia u kobiet karmiących piersią jest istotnym zagadnieniem, ponieważ leki lub ich aktywne metabolity mogą przenikać do mleka matki, a w konsekwencji do organizmu dziecka. Wiąże się to z ryzykiem działań niepożądanych, w tym długofalowych skutków związanych ze szkodliwym wpływem na różne narządy w rozwijającym się młodym organizmie. W związku z tym, bezpieczeństwo stosowania farmaceutyków przez kobiety w okresie laktacji jest kluczowe. Jednakże badania *in vivo* w tym temacie są bardzo trudne i problematyczne ze względu na aspekt etyczny i zazwyczaj są ograniczone do obserwacji pojedynczych przypadków (*case study*) lub badań prowadzonych na małych grupach. Wyniki uzyskiwane w ten sposób są jednak fragmentaryczne i trudno wyciągać na ich podstawie wnioski dotyczące szerokiej populacji. W takim przypadku metody *in silico* oparte

na modelowaniu wykorzystującym zależności między strukturą związku a jego właściwościami (QSPR) są niezwykle pomocne. Znalezienie określonych korelacji i opracowanie modeli matematycznych pozwalających na predykcję przenikania leków o różnorodnej strukturze i różnych właściwościach fizyko-chemicznych do mleka pozwoliłoby na oszacowanie ryzyka narażenia dziecka. Właśnie taki ambitny cel postawiła przed sobą Pani Magister prowadząc badania w ramach przygotowania pracy doktorskiej. Podjęta tematyka jest ważna nie tylko z naukowego punktu widzenia ale również ze względów praktycznych i wpisuje się w aktualne trendy badań naukowych.

Oceniana rozprawa doktorska została przygotowana w standardowym układzie, typowym dla prac o charakterze doświadczalnym. Liczy 208 stron i została podzielona na 5 głównych części: Część teoretyczną, Część doświadczalną, Badania własne, Wnioski i Bibliografię, w ramach których zostały wyodrębnione racjonalnie zaplanowane podrozdziały. Na początku rozprawy zamieszczono wykaz skrótów, który znacznie ułatwia lekturę dysertacji oraz krótkie wprowadzenie.

W części teoretycznej Doktorantka szczegółowo omówiła skład mleka kobiecego, scharakteryzowała czynniki warunkujące przenikanie leków do mleka, podała klasyfikacje leków ze względu na ryzyko ich stosowania w czasie laktacji, omówiła główne białka osocza i ich funkcje oraz mechanizm odpowiedzialny za wiązanie z substancjami leczniczymi i ich transportu przez błony komórkowe. Ponadto charakteryzowała metody chemometryczne przydatne w szeroko pojętych badaniach leków. Literaturowa część pracy napisana jest w sposób przemyślany, stanowi dobre nakreślenie tła do prowadzonych badań, świadczy o odpowiednim przygotowaniu teoretycznym oraz o umiejętności korzystania ze źródeł bibliograficznych.

Część doświadczalna zawiera syntetyczne przedstawienie celów pracy, następnie Pani Magister przedstawia opis przeprowadzonych eksperymentów oraz wykorzystywane materiały. Trochę w tej części dysertacji zabrakło mi odrębnego rozdziału dotyczącego aparatury – pozwoliłoby to na uniknięcie niepotrzebnych powtórzeń w kilku miejscach. Na tym etapie zwraca uwagę czasochłonność i pracochłonność prac eksperymentalnych – Doktorantka wyizolowała i sprawdziła czystość 237 substancji, które wykorzystała do analiz chromatograficznych. Dane chromatograficzne uzyskała stosując dwie techniki: chromatografię cienkowarstwową oraz wysokosprawną chromatografię cieczową. W obu, jako model odzwierciadlający powinowactwo substancji do składników mleka, a w konsekwencji zdolność do przenikania przez bariery biologiczne, zastosowała modyfikowane białkiem fazy

stacjonarne: płytki TLC impregnowane roztworami bydlęcej albuminy osoczowej (BSA), a w HPLC zastosowała kolumnę z fazą stacjonarną immobilizowaną ludzką albuminą (HSA) oraz sztuczną membranę (IAM). Faza ruchoma została tak dobrana aby zbliżyć warunki do fizjologicznego pH krwi.

Badania własne Doktorantka przedstawiła w formie 25 tabel (Tab. 7-31), 38 rysunków (Rys.2-39) i kilkunastu opracowanych równań. Struktury związków, właściwości biologiczne, fizykochemiczne i dane chromatograficzne zostały zebrane na końcu dysertacji w trzynastu dodatkowych obszernych tabelach (Tab. 32-44). Wyniki badań zostały czytelnie opracowane oraz wyczerpująco omówione i przedyskutowane, a założone cele badań zrealizowane. Pani Magister zebrała dane chromatograficzne dla 184 związków w doświadczeniu HPLC oraz dla 198 związków w doświadczeniach RP i NP TLC. Badaniami objęła związki o charakterze kwasowym, zasadowym i obojętnym. Uzyskane dane Autorka wykorzystała do stworzenia modeli matematycznych umożliwiających ocenę przenikania wybranych ksenobiotyków do mleka kobiecego, porównała przydatność różnych metod analizy statystycznej do w/w celu, a także określiła korelacje między parametrami związanymi z właściwościami analizowanych związków.

Wnioski wynikające z prowadzonych doświadczeń zostały poprawnie sformułowane. Choć myślę iż rozdział „Wnioski” można by było zatytułować „Podsumowanie i Wnioski”. Ponadto punktowe przedstawienie najważniejszych osiągnięć doktorantki poskutkowałoby uzyskaniem bardziej przejrzystej i syntetycznej formy tego rozdziału. Doktorantka wykazała, że modele analityczne oparte na warunkach zbliżonych do fizjologicznych mogą być użyteczne we wstępnych badaniach związków leczniczych. Przeprowadzone analizy statystyczne, udowodniły ścisły związek danych uzyskanych z metod chromatograficznych z przenikaniem leków do mleka matki – najlepsze efekty uzyskano wykorzystując dane z chromatografii cienkowarstwowej w normalnym układzie faz (NP TLC) oraz z wysokosprawnej chromatografii cieczowej na fazie stacjonarnej immobilizowanej ludzką albuminą. Doktorantka zauważyła zwiększoną zależność pomiędzy odsetkiem związania leku z białkami osocza i danymi chromatograficznymi dla związków o charakterze kwasowym. Szczególnie interesujące jest, że do konstruowania modeli farmakokinetycznych, może służyć prosta i stosunkowo niedroga metoda TLC. Doktorantka wykazała, że wprowadzenie do analiz numerycznych parametrów uzyskanych z chromatografii cienkowarstwowej w normalnym układzie faz z wykorzystaniem adsorbentów modyfikowanych bydlęcą albuminą osoczową, zwiększyło możliwości predykcji przenikania leków do mleka matki.

Piśmiennictwo wykorzystane do opracowania dysertacji zawiera 155 pozycji, są to prawie wyłącznie pozycje anglojęzyczne opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej. Literatura jest aktualna, i ściśle dotyczy tematyki podjętej w rozprawie doktorskiej.

Ogólnie jakość prowadzonych badań i całą rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Warto też podkreślić, że Pani Magister jest współautorką 6 prac opublikowanych w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (całkowity IF = 11,364; 353 pkt.).

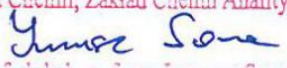
Niezależnie od mojej wysokiej oceny jakości badań opisywanych w przedłożonej dysertacji, pragnę z obowiązku recenzenta przedstawić kilka drobnych uwag/sugestii – głównie natury edytorskiej:

- 1) Wprowadzenie numeracji rozdziałów i podrozdziałów zapewniłoby czytelniejszą strukturę dysertacji co ułatwiłoby czytelnikowi poruszanie się po jego zawartości,
- 2) Zwyczajowo należy najpierw zacytować rysunek w tekście a następnie go przedstawić (uwaga do rys. 1 i 2),
- 3) Na niektórych rysunkach osie podpisane są w języku angielskim,
- 4) Tabela 16 nie została zacytowana w tekście,
- 5) „Roztwory substancji były nanoszone na płytki TLC przy pomocy automatycznego aplikatora Desaga” – brak szczegółów eksperymentalnych np. ile nanoszono, jaką objętość, jaką szerokość miały pasma itd.,
- 6) Zastanawia mnie również długość fali wybrana do doświadczeń: Analityczna długość fali była taka sama dla wszystkich związków i wynosiła 210 nm?
- 7) W pracy pojawiają się również drobne błędy edytorskie i „niezręczne” sformułowania, kilka przykładów podaję poniżej:
 - Str. 12.: „Zalety karmienia piersią są szeroko opisywane w literaturze fachowej, obejmują one m.in. redukcję ryzyka wystąpienia chorób dolnych dróg oddechowych u dzieci poniżej 1 r.ż., zmniejszenie występowania infekcji żołądkowo-jelitowych u noworodków, **zapobiega** nadwadze i otyłości w dorosłym życiu, a nawet **obniża** ryzyko wystąpienia nagłej śmierci łóżeczkowej”
 - Str. 15: „Tabela 2. Ryzyko stosowania w czasie laktacji - klasyfikacja prof. Hale’a” – raczej powinno być: klasyfikacja leków ze względu na (ta sama uwaga do Tab. 4)
 - Str. 17: Brak tłumaczenia M/P – milk-to-plasma ratio
 - Str. 23: „Wyróżniamy dwa podstawowe rodzaje transportu przez błony komórkowe: transport bierny (dyfuzja prosta i ułatwiona)” – Doktorantka nie wspomina o drugim rodzaju transportu

- Str. 25: „uzyskiwały tam większe stężenie niż to zakładano” – powinno być: niż to zakładane
- Str.29: „Preparaty mające na celu działające” – działanie
- Str. 43: „Następnie płytki zostały wywołane w fazie ruchomej (...) – raczej rozwijane
- Str.56: „na przykład zdolnościa” – na przykład zdolność
- W wielu miejscach pracy pojawia się sformułowanie: „związków kwaśnych” powinno być raczej o charakterze kwasowym

Jednak pragnę podkreślić, że powyższe uwagi nie umniejszają w żaden sposób wartości merytorycznej przedłożonej do recenzji dysertacji.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest nie tylko interesująca ale cechuje się również dużą wartością praktyczną uzyskanych wyników. Realizacja celu jaki postawiła sobie mgr Karolina Wanat wymagała ogromnej pracy eksperymentalnej i praktycznej umiejętności posługiwania się zarówno metodami chromatograficznymi jak i analizami numerycznymi. Dysertacja wnosi w obecny stan wiedzy znaczny element nowości naukowej. Badania cechują się oryginalnością, a zakres przeprowadzonych badań oraz sposób ich prezentacji, wyczerpujące omówienie i umiejętność wyciągania trafnych wniosków na poszczególnych etapach pracy świadczą o wysokim poziomie naukowym Doktorantki i Jej predyspozycjach do prowadzenia badań naukowych. Na tej podstawie stwierdzam, że recenzowana dysertacja w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym, z wielką przyjemnością mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie mgr Karoliny Wanat do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na istotne walory oryginalności naukowej oraz mając na uwadze wysoką jakość uzyskanych wyników, wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Katedra Chemii, Zakład Chemii Analitycznej

prof. dr hab. n. farm. Ireneusz Sowa