Prof. Marek Wesołowski
Katedra i Zakład Chemii Analitycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Barbary Żuromskiej-Witek pt.:
***Wpływ rodzaju utleniacza stosowanego w warunkach stresowych na przemiany wybranych fluorochinolonów,* wykonanej pod kierunkiem dr hab. Urszuli Hubickiej oraz dr Anny Maślanki jako promotora pomocniczego, w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Collegium Medicum**

Mgr Barbara Żuromska-Witek zajęła się problematyką trwałości substancji leczniczych. Konieczność prowadzenia tego rodzaju badań wynika z faktu, iż wiele aktywnych substancji farmaceutycznych jest bardzo wrażliwych na wilgoć, tlen i światło (promieniowanie UV) oraz temperaturę. Wpływ tych czynników powoduje, że mało trwałe substancje łatwo ulegają degradacji do związków o podobnej strukturze chemicznej, ale niekoniecznie o tym samym profilu działania. Utworzone produkty rozkładu są zanieczyszczeniami aktywnych substancji farmaceutycznych, a ich obecność w lekach jest niepożądana głównie z uwagi na fakt, iż mogą odznaczać się znaczną toksycznością, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, stwarzając w ten sposób potencjalne ryzyko dla zdrowia i życia pacjenta. Ponadto, zdarza się, że zanieczyszczenia mogą być teratogenne (generują wady rozwojowe płodu), mutagenne (zmieniają ilość i strukturę materiału genetycznego w komórce) lub kancerogenne (indukują nowotwory). W niektórych przypadkach zanieczyszczenia mogą być również aktywne chemicznie, reagując z substancjami pomocniczymi stosowanymi technologii postaci leku. Sytuację dodatkowo pogarsza fakt, że o ile zanieczyszczenia mogą być usunięte z substancji aktywnych, np. w procesie oczyszczania, to usunięcie produktów degradacji z gotowej formy leku nie jest technicznie możliwe.

Wyżej uzasadniona konieczność badania trwałości substancji leczniczych generuje dodatkowy problem, jakim jest opracowanie i walidacja takich metod analitycznych, które pozwoliłyby wykryć początek degradacji substancji leczniczej, oznaczyć jej zawartość obok produktów rozkładu, a ponadto określić ilość i strukturę chemiczną produktów degradacji. Jest

to zadanie bardzo trudne, wymaga użycia zaawansowanych technik instrumentalnych z uwagi na niskie, lub wręcz śladowe ilości produktów degradacji oraz bardzo duże podobieństwo struktury chemicznej wszystkich badanych analitów. W powyższym kontekście, badania nad zachowaniem się substancji leczniczych w warunkach stresowych są szczególnie pożądane i spełniają trudną do przecenienia rolę, poprzez wskazanie warunków, jakie należy zachować aby wytworzyć takie formy gotowych preparatów farmaceutycznych, które zapewnią skuteczność i bezpieczeństwo terapii na najwyższym, możliwym poziomie.

Rozprawa doktorska mgr Barbary Żuromskiej-Witek ma układ typowy, składa się 5 rozdziałów (Wstęp, Cele badawcze, Wyniki badań, Podsumowanie i wnioski oraz Bibliografia), a ponadto obejmuje Streszczenie i Abstract oraz 2 załączniki; Kopie artykułów stanowiących cykl publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej oraz Oświadczenia współautorów prac tworzących cykl. Zasadniczym elementem doktoratu jest zbiór 4 artykułów powiązanych tematycznie i opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Treść tych prac stanowią wyniki badań nad wpływem różnego rodzaju utleniaczy na degradację wybranych fluorochinolonów w warunkach stresowych.

Należy podkreślić, że problematyka badawcza podjęta przez mgr Barbarę Żuromską-Witek jest nadal aktualna i ma bardzo duże znaczenie praktyczne szczególnie dla przemysłu farmaceutycznego, z uwagi zagrożenia, jakie generują produkty degradacji tworzące się w handlowych produktach leczniczych. Potwierdza to także wzrastająca liczba decyzji Głównego Inspektora Farmaceutycznego, których konsekwencją jest wycofanie z obrotu aptecznego leków z powodu wykrycia zanieczyszczeń. Jednak większość zanieczyszczeń występowała w wycofanych lekach prawdopodobnie „od zawsze", ale ich wykrycie obecnie było wynikiem ogromnego postępu w obszarze analityki farmaceutycznej, skutkującego wprowadzeniem technik wysoce selektywnych i czułych, umożliwiających wykrycie, identyfikację i analizę ilościową coraz niższych stężeń zanieczyszczeń. Dlatego realizacja badań degradacji oksydacyjnej fluorochinolonów za pomocą UPLC sprzężonej z spektrometrem mas jest krokiem we właściwym kierunku, istotnie podnoszącym wiarygodność uzyskanych wyników.

Zasadniczą część Wstępu do rozprawy doktorskiej mgr B. Żuromska-Witek poświęciła omówieniu zagadnień związanych z realizacją badań trwałości leków. Zwróciła uwagę na fakt, że wytyczne ujęte w międzynarodowym dokumencie ICH Q1A(R2) nie precyzują szczegółowo warunków wykonania badań stresowych, a w szczególności, brak jest sugestii odnośnie użycia konkretnych czynników utleniających. W związku z tym konieczne jest indywidualne podejście do badanych substancji z uwzględnieniem ich właściwości fizyko-chemicznych i zrozumieniem

procesów związanych z degradacją oksydacyjną leków. Dlatego w kolejnych podrozdziałach Doktorantka szczegółowo wyjaśniła mechanizmy degradacji oksydacyjnej, tj. autoutleniania, mechanizmu nukleofilowego/elektrofilowego i utleniania poprzez przeniesienie pojedynczego elektronu na cząsteczkę tlenu, a także szeroko omówiła często stosowane środki do utleniania aktywnych substancji farmaceutycznych.

Wartościowym elementem Wstępu jest również charakterystyka badanej grupy leków, tj. fluorochinolonów, substancji o szerokim spektrum działania antybakteryjnego. Po krótkim omówieniu ich aktywności biologicznej, Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała relacje między strukturą chemiczną a aktywnością przeciwbakteryjną fluorochinolonów wskazując, że wprowadzenie określonych grup do podstawowej struktury tych substancji może istotnie modyfikować ich właściwości biologiczne i fizyko-chemiczne. Zagadnieniem stanowiącym istotną treść pracy doktorskiej jest też przegląd literatury odnośnie degradacji oksydacyjnej fluorochinolonów z użyciem nadtlenku wodoru i manganianu(VII) potasu jako czynników utleniających.

Ostatni rozdział Wstępu jest dobrym uzasadnieniem proponowanego celu badań, ale jego słabość wynika z ograniczenia przeglądu tylko do 4 fluorochinolonów badanych w ramach tej rozprawy i 2 czynników utleniających. Brakuje natomiast danych o degradacji pozostałych fluorochinolonów i innych czynnikach stresowych wpływających na degradację tej grupy substancji. Tak wąskie ujęcie tematu jest o tyle niezrozumiałe, że wpływ innych czynników stresowych, np. promieniowania UV na trwałość fluorochinolonów jest dobrze znany Doktorantce, co potwierdzają wyniki badań zrealizowanych i opublikowanych z Jej udziałem (doi: 10.1186/1752-153X-7-133).

Opracowany przez mgr B. Żuromską-Witek Wstęp do rozprawy doktorskiej wskazuje na dogłębne poznanie zagadnień, którymi zajmowała się podczas wykonywania, a następnie publikowania wyników prac eksperymentalnych. Opracowane na jego podstawie Cele pracy doktorskiej zostały sformułowane jasno i logicznie. Podkreślając szczególną rolę degradacji oksydacyjnej, która obok hydrolizy jest jedną z najważniejszych ścieżek rozkładu substancji leczniczych, Doktorantka zajęła się zbadaniem wpływu utleniaczy stosowanych w warunkach stresowych na degradację fluorochinolonów. Spośród licznych przedstawicieli tej grupy leków, wybrała cztery; ciprofloksacynę, lomefloksacynę, pefloksacynę i balofloksacynę, badając wpływ nadtlenku wodoru, manganianu(VII) potasu i kwasu 4,4,-azobis(4-cyjanopentanowego) jako środków utleniających na ich degradację.

W celu pracy Doktorantka ujęła również opracowanie i walidację zaawansowanej techniki analitycznej, której rolą było oznaczenie badanych substancji obok ich produktów degradacji oraz identyfikacja produktów degradacji. Istotnym elementem proponowanym do realizacji była także ocena kinetyczna procesów degradacji 4 fluorochinolonów. Ponadto, w uzupełnieniu celu ujęto też ocenę aktywności przeciwbakteryjnej i cytotoksyczności wybranych produktów degradacji oksydacyjnej.

Realizując przedstawione wyżej cele badań, Doktorantka zmierzała do kompleksowego opracowania wyników badań, obejmujących degradację oksydacyjną 4 fluorochinolonów w warunkach stresowych pod wpływem 3 oksydantów. W końcowym efekcie, porównanie profili produktów degradacji uzyskanych wskutek działania różnych oksydantów pozwoli na ocenę ich przydatności do badań stresowych pozostałych leków z tej grupy.

Wykonane przez mgr B. Żuromską-Witek prace eksperymentalne związane z realizacją celu badań wraz z uzyskanymi wynikami, dyskusją i wnioskami zostały opublikowane w formie 4 artykułów naukowych:

1. Hubicka U., Żmudzki P., Żuromska-Witek B., Zajdel P., Pawłowski M., Krzek J. Separation and characterization of ciprofloxacin, difloxacin, lomefloxacin, norfloxacin and ofloxacin oxidation products under potassium permanganate treatment in acidic medium by UPLC-MS/MS. Talanta, 2013, 109, 91-100 (IF = 3,511; punkty ministerstwa = 40),
2. Hubicka U., Żmudzki P., Żuromska-Witek B., Zajdel P., Krzek J. Determination and characterization of selected fluoroquinolones oxidation products under potassium permanganate treatment. Acta Poloniae Pharmaceutica, 2015, 72, 1101-1114 (IF = 0,877; punkty ministerstwa = 15),
3. Żuromska-Witek B., Żmudzki P., Szlósarczyk M., Maślanka A., Hubicka U. Development and validation of stability-indicating HPLC methods for the estimation of lomefloxacin and balofloxacin oxidation process under ACVA, H_2O_2, or $KMnO_4$. Kinetic evaluation and identification of degradation products by mass spectrometry. Molecules, 2020, 25, 5251-5275 (IF = 4,411; punkty ministerstwa = 140),
4. Żuromska-Witek B., Żmudzki P., Szlósarczyk M., Abram M., Maślanka A., Hubicka U. Study of oxidation of ciprofloxacin and pefloxacin by ACVA: identification of degradation products by mass spectrometry and bioautographic evaluation of antibacterial activity. Processes, 2022, 10, 1022 (IF = 3,352; punkty ministerstwa = 70).

Publikacja wyników prac będących tematem doktoratu w recenzowanych czasopismach o obiegu międzynarodowym świadczy o wysokim poziomie naukowym badań, poprawności

merytorycznej i zainteresowaniu tematem. Wyniki opublikowane przez mgr B. Żuromską-Witek potwierdziły przydatność opracowanych metod analitycznych (UPLC-MS/MS) do oznaczania fluorochinolonów obok produktów degradacji oksydacyjnej oraz do identyfikacji struktury chemicznej produktów degradacji. Wymiernym dowodem są parametry walidacyjne zestawione w publikacjach, wskazujące, że opracowane procedury spełniają kryteria akceptacji dla metod stosowanych w analizie ilościowej (wymagania ICH).

Publikacja pierwsza (Talanta, 2013) przedstawia wyniki badań degradacji oksydacyjnej ciprofloksacyny i lomefloksacyny pod wpływem manganianu(VII) potasu w zakresie pH = 3-6. Doktorantka wykazała, że rozkład badanych substancji przebiega zgodnie z reakcją II rzędu. Ponadto, proces degradacji odzwierciedlany przez stałą szybkości reakcji zależy od badanej substancji, czasu inkubacji i od pH roztworu. Wartościowym elementem publikacji są wyniki badań przedstawiające proponowane struktury chemiczne produktów degradacji. W przypadku ciprofloksacyny zidentyfikowano 6 produktów degradacji, natomiast 3 dla lomefloksacyny. Spośród badanych leków, ciprofloksacyna okazała się najbardziej wrażliwa na utlenianie manganianem(VII) potasu, podczas gdy lomefloksacyna jest najbardziej odporna. Osiągnięciem pracy jest również opracowanie schematów degradacji badanych substancji, które ilustrują kolejne etapy destrukcji oksydacyjnej ciprofloksacyny i lomefloksacyny.

Wyniki badań degradacji oksydacyjnej pefloksacyny pod wpływem manganianu(VII) potasu w zakresie pH od 3 do 6 przedstawiono w publikacji drugiej (Acta Poloniae Pharmaceutica, 2015). W pracy wiele miejsca poświecono walidacji opracowanej procedury separacji i oznaczania fluorochinolonów obok produktów degradacji, potwierdzając satysfakcjonującą rozdzielczość i czułość metody. Ogólne wnioski z przeprowadzonych badań są zgodne z wnioskami zawartymi w pierwszej publikacji. Pefloksacyna okazała się również substancją najbardziej wrażliwą na utlenianie manganianem(VII), a jej rozkład generuje 5 produktów degradacji. Podsumowując uzyskane dane stwierdzono, że degradacja oksydacyjna zachodzi głównie w obrębie ugrupowania piperazyny, skutkując utworzeniem odpowiednich hydroksy- i oksy-pochodnych. Dalsze utlenianie substancji, po dealkilacji i degradacji piperazyny, prowadzi do utworzenia 7-aminoflurochinolonu.

Kontynuację badań nad utlenianiem manganianem(VII) potasu ostatniej z badanych substancji, balofloksacyny, przedstawiono w publikacji trzeciej (Molecules, 2020). Wykryto 4 produkty degradacji oksydacyjnej, a wnioski z badań są podobne to tych z poprzednich prac. W publikacji trzeciej zamieszczono ponadto wyniki badań nad utlenianiem balofloksacyny i lomefloksacyny przy użyciu nadtlenku wodoru i kwasu 4,4,-azobis(4-cyjanopentanowego),

przy czym badania nad użyciem ostatniego czynnika stresowego do utleniania ciprofloksacyny i pefloksacyny przedstawiono w ostatniej publikacji (Processes, 2022). Wskazano na wpływ badanej substancji, czasu inkubacji i temperatury, w której prowadzono utlenianie kwasem 4,4,-azobis(4-cyjanopentanowym), na przebieg procesu degradacji. Na uwagę zasługują też prace nad określeniem toksyczności i aktywności antybakteryjnej produktów degradacji oksydacyjnej ciprofloksacyny i pefloksacyny.

Osiągnięte wyniki wskazały, że szeroko stosowany nadtlenek wodoru jest najsłabszym czynnikiem stresowym, natomiast utlenianie manganianem(VII) potasu prowadzi do degradacji badanych fluorochinolonów w najszerszym zakresie, stwarzając warunki do uzyskania większej liczby produktów rozkładu (potencjalnych zanieczyszczeniach leków) i ułatwiając opracowanie orientacyjnego mechanizmu degradacji oksydacyjnej badanych pochodnych. Jest to cenny wniosek z przeprowadzonych badań, ale powstaje pytanie, czy uzyskaną tak dużym nakładem pracy charakterystykę użytych czynników utleniających można odnieść do innych grup leków, różniących się istotnie podstawową strukturą chemiczną od fluorochinolonu.

Podsumowując materiał faktograficzny przedstawiony w 4 opublikowanych pracach mogę z pełnym przekonaniem stwierdzić, że wszystkie prace eksperymentalne zostały dobrze zaplanowane, wykonane, a uzyskane wyniki zinterpretowane i opublikowane w wiodących wydawnictwach przypisanych do dyscypliny nauki farmaceutyczne. Wartość współczynnika IF dla tych prac wynosi 12,151, natomiast punktacja ministerstwa = 265. W 2 pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Poza mgr B. Żuromską-Witek, współautorami cyklu publikacji będących podstawą doktoratu jest 8 pracowników z 2 katedr Wydziału Farmaceutycznego CM UJ. Zgodnie z oświadczeniami, dr P. Żmudzki wykonał analizy UPLC-MS/MS i ustalił struktury produktów degradacji (w jednej pracy wspólnie z dr Michałem Abramem), natomiast pozostali współautorzy pomagali przy redakcji tekstu artykułów. Doktorantka jest natomiast współtwórcą koncepcji i metodologii badań oraz wykonawcą wszystkich pozostałych badań. Jej wiodący udział w uzyskaniu wiarygodnych danych eksperymentalnych oraz ich poprawnej interpretacji znajduje również odzwierciedlenie w zwięzłym i logicznie ujętym Podsumowaniu i wnioskach z przeprowadzonych badań.

Całości rozprawy doktorskiej dopełnia zamieszczone na końcu pracy Piśmiennictwo. Obejmuje ono 68 pozycji, przy czym więcej niż połowa cytowanych prac została opublikowana w okresie ostatnich 10 lat. Podkreśla to aktualność zebranego piśmiennictwa, które obejmuje w zdecydowanej większości profesjonalne, angielskojęzyczne monografie, oryginalne artykuły i odniesienia do stron internetowych. Cytowane piśmiennictwo potwierdza, że mgr B. Żuromska-

Witek należycie rozpoznała problematykę badawczą, którą zajmowała się w trakcie doktoratu. Potwierdza również dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki do poprawnej interpretacji uzyskanych wyników i ich krytycznej dyskusji.

Pod względem redakcyjnym rozprawa doktorska została opracowana starannie. Układ pracy jest przejrzysty i logiczny, a rozmieszczenie rycin i tabel prawidłowe.

W świetle wyżej przedstawionej, wysokiej oceny rozprawy autorstwa mgr Barbary Żuromskiej-Witek nt. *Wpływ rodzaju utleniacza stosowanego w warunkach stresowych na przemiany wybranych fluorochinolonów*, stwierdzam, że praca doktorska spełnia warunki formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.), a także wydanych na jej podstawie rozporządzeń. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Collegium Medicum, o dopuszczenie mgr Barbary Żuromskiej-Witek do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Marek Wesołowski

Gdańsk, dnia 19 czerwca 2023 r.