Lublin, 04.07.2023

Prof. dr hab. Anna Gumieniczek

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Barbary Żuromskiej-Witek

pt. „Wpływ rodzaju utleniacza stosowanego w warunkach stresowych na przemiany wybranych fluorochinolonów”

Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum

Uniwersytetu Jagiellońskiego

Praca doktorska mgr Barbary Żuromskiej-Witek została przygotowana w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej CM UJ pod kierunkiem dr hab. Urszuli Hubickiej jako promotora i dr Anny Maślanki jako promotora pomocniczego. Oceniana praca dotyczy analizy wybranych fluorochinolonów poddanych wymuszonej degradacji w warunkach utleniających, pod kątem wpływu zastosowanych utleniaczy na drogi rozpadu badanych leków oraz ich aktywność biologiczną.

Fluorochinolony są chemioterapeutykami o szerokim spektrum aktywności przeciwbakteryjnej. Ostatnio nie są zalecane do leczenia infekcji przebiegających bez powikłań, ze względu na częste i poważne działania niepożądane, są jednak nadal jednymi z najczęściej stosowanych leków w infekcjach bakteryjnych dotyczących różnych tkanek i narządów. W Polsce najczęściej używanymi fluorochinolonami są cyprofloksacyna i lewofloksacyna. Dostępne są również norfloksacyna, pefloksacyna, ofloksacyna, moksyfloksacyna i prulifloksacyna.

Gdy substancja lecznicza jest trwała chemicznie, oznacza to, że nie dochodzi do jej degradacji pod wpływem określonych czynników zewnętrznych. Jest to stan pożądany i aby go zapewnić przez jak najdłuższy okres, wykonywane są badania stabilności substancji, aby poznać jej właściwości i ewentualnie wprowadzić odpowiednie zabezpieczenia przed nadmiernym rozkładem. Celem jest jak najdłuższe zapewnienie jakości produktu leczniczego, a przez to bezpieczeństwa pacjentom gdyż labilność chemiczna skutkować może powstaniem potencjalnie niebezpiecznych zanieczyszczeń. Znajomość właściwości substancji i dróg jej degradacji pod wpływem różnych czynników umożliwia zapobieganie takim zjawiskom przez przemysł farmaceutyczny. Przykładem może być stosowanie opakowań leków nieprzepuszczających promieniowania słonecznego dla leków ulegających rozkładowi pod wpływem światła. W niektórych przypadkach, aby zapobiec degradacji substancji wystarczy zmiana w procesie projektowania leku lub odpowiednie przechowywanie gotowego produktu leczniczego.

Badania stresowe leków dostarczają informacji na temat potencjalnych produktów degradacji, a w dalszym etapie służą do określenia toksyczności tych produktów dla pacjenta, a także środowiska naturalnego, do którego trafiają wraz z odpadami komunalnymi. Ten ostatni aspekt podkreśliła w swojej pracy Doktorantka, zakładając, że otrzymane przez Nią wyniki będą mogły być wykorzystane do nie tylko w odniesieniu do technologii postaci leku, ale także do eliminacji fluorochinolonów z naturalnego środowiska wodnego.

Powyższe kwestie w pełni uzasadniają cel, który postawiła przed sobą mgr Żuromska-Witek, a więc przeprowadzenie degradacji oksydacyjnej wybranych fluorochinolonów w obecności różnych utleniaczy, identyfikację powstających produktów rozkładu oraz, co jest warte podkreślenia, ocenę aktywności przeciwbakteryjnej i cytotoksyczności wybranych produktów degradacji. Oceniana praca jest oparta na 4 pracach oryginalnych prezentujących wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Doktorantkę i opublikowanych w czasopismach o znaczącej wartości IF. W artykułach zaliczonych do cyklu przedstawiono wyniki badań poszerzających wiedzę na temat trwałości chemicznej i aktywności biologicznej wybranych fluorochinolonów, tj. cyprofloksacyny, lomefloksacyny, pefloksacyny i balofloksacyny, polegających na:

1. opracowaniu zwalidowanych metod do ilościowej oceny badanych fluorochinolonów w obecności produktów degradacji oksydacyjnej
2. przeprowadzeniu degradacji oksydacyjnej wybranych fluorochinolonów w obecności trzech utleniaczy i ocenie kinetyki rozkładu
3. identyfikacji produktów rozkładu i ustaleniu dróg degradacji dla poszczególnych leków
4. porównaniu użytych utleniaczy wraz z oceną ich przydatności w badaniach stresowych
5. ocenie aktywności przeciwbakteryjnej i cytotoksyczności wybranych produktów degradacji.

Jestem przekonana, że cel pracy postawiony przez Doktorantkę jest uzasadniony, a przeprowadzone badania mają znaczenie zarówno teoretyczne jak i praktyczne. Zaprezentowane wyniki wnoszą nowe informacje do nauki i stanowią cenny wkład w rozwój chemii farmaceutycznej.
Nadesłana do oceny praca doktorska liczy 66 stron tekstu własnego obejmującego autoreferat oraz streszczenia w języku polskim i angielskim oraz kopie 4 artykułów stanowiących cykl publikacji i oświadczenia współautorów. Opublikowane prace oryginalne pochodzą z uznanych czasopism o współczynniku wpływu wynoszącym sumarycznie 12,151 i sumie punktów MEiN równej 265.

Tekst autoreferatu został podzielony w sposób typowy dla prac naukowych na rozdziały, a następnie na podrozdziały, co porządkuje przedstawiane treści i ułatwia ich lekturę.

Pierwszy podrozdział Wstępu jest poświęcony ogólnym zagadnieniom związanym z trwałością leków, badaniami stresowymi, w tym degradacją oksydacyjną. Ważną częścią Wstępu jest kolejny podrozdział poświęcony fluorochinolonom jako lekom o charakterystycznej strukturze, którą można

w istotnym stopniu modyfikować, zachowując lub korzystnie zmieniając ich aktywność przeciwbakteryjną. Ten rozdział jest w pewnym stopniu rozszerzeniem dotyczących całej grupy fluorochinolonów i dotyczy różnych leków z tej grupy, nie tylko tych badanych przez Doktorantkę. Ale z drugiej strony, ta część stanowi bardzo ciekawe opracowanie i dostarcza bardzo wielu ciekawych informacji na temat zależności budowy chemicznej i działania przeciwbakteryjnego poszczególnych fluorochinolonów.

Bardzo ciekawą częścią Wstępu jest także podrozdział poświęcony poszczególnym utleniaczom używanym w badaniach stresowych leków oraz mechanizmom poszczególnych procesów oksydacyjnych. Ta część jest niewątpliwie dobrym źródłem wiedzy dla badaczy zajmujących się wymuszoną degradacją leków, tym bardziej, że oficjalne wytyczne w zakresie badań degradacyjnych, pozostawiają badaczom dość dużą dowolność w tym zakresie. We Wstępie omówione zostały także dotychczasowe badania dotyczące fluorochinolonów w zakresie badań degradacyjnych z użyciem utleniaczy, a także metody in vitro służące ocenie aktywności przeciwbakteryjnej substancji aktywnych. W końcowej części Wstępu Doktorantka omówiła krótko postawione przez siebie cele badawcze, czyli główny cel pracy oraz 6 celów szczegółowych.

Tak opracowany Wstęp ułatwia odbiór dalszej części pracy, w tym omówienie uzyskanych wyników. Część teoretyczna jest napisana syntetycznie i przejrzyście, w sposób ukierunkowany na główny temat pracy. Całość jest spójna i zrozumiała. Stanowi ona ciąg uzupełniających się informacji z podkreśleniem elementów nowości naukowej. Doktorantka wykazała umiejętność krytycznego korzystania z literatury naukowej i zdolność krytycznej analizy uzyskanych informacji. Jednocześnie cytowane piśmiennictwo jest adekwatne i aktualne. Cel pracy został sformułowany poprawnie i jasno, a cele szczegółowe odpowiadają etapom jego realizacji i są logicznie zaplanowane.

W rozdziale II opisano wyniki osiągnięte w poszczególnych etapach pracy, dlatego poszczególne podrozdziały odpowiadają szczegółowym celom badawczym opisanym we Wstępie. Sposób przygotowania niniejszej pracy potwierdza dobre przygotowanie praktyczne Doktorantki, które było niezbędne do przeprowadzenia zaplanowanych badań. Pod względem doboru metod praca nie budzi zastrzeżeń. W omówieniu wyników Doktorantka zwraca uwagę, że wszystkie opracowane metody analizy ilościowej zostały w pełni zwalidowane, co podwyższa rangę wyników otrzymanych w badaniach degradacji, np. badań dotyczących kinetyki rozkładu badanych fluorochinolonów.

W omówieniu wyników zawarto kilka ciekawych spostrzeżeń. Podczas utleniania cyprofloksacyny, lomefloksacyny, balofloksacyny i pefloksacyny za pomocą $KMnO_4$ w środowisku kwasowym w środowisku pH <6 w czasie 0-60 min, stwierdzono, że największy rozkład badanych leków występuje przy pH ok. 4. Jednocześnie zwraca uwagę informacja na str. 39 dotycząca balofloksacyny, że w tym przypadku rozkład przebiegał szybko i po 60 min wynosił 20,81%, podczas gdy dla innych badanych leków zanotowano 70, 37 i 85% rozkładu. Jak należy rozumieć taką interpretację?

W przypadku użycia $H_2O_2$ jako utleniacza w temperaturze pokojowej stresowanie leków prowadzono przez 96h, 168h i 56 dni, w zależności od leku. Zabrakło mi w tym miejscu informacji, na jakiej zasadzie ustalano optymalną długość testu stresowego. W innym miejscu pracy pojawia się informacja, że długość testu stresowego dobierano w zależności od leku i temperatury (na str. 44). O ile zależność szybkości rozkładu od temperatury wydaje się oczywista, o tyle nie jest jasne dla czytającego, jak dobierano czas stresowania w zależności od leku. W jeszcze innym miejscu pracy (na str. 40) stwierdzono, że substancja nie ulega utlenianiu, gdyż „na chromatogramach nie zanotowano pików produktów degradacji". Czy to była jedyna przesłanka do takiego stwierdzenia?
Otrzymane wyniki wyraźnie wskazują na mniejszy rozkład leków pod wpływem $H_2O_2$ niż $KMnO_4$. Z kolei, w badaniach z użyciem ACVA jako utleniacza oceniano rozkład fluorochinolonów w różnych rozpuszczalnikach, stwierdzając, że w obecności metanolu zamiast wody, rozkład badanych leków zachodzi w mniejszym stopniu. Otrzymane wyniki wskazują, że rozkład badanych substancji w podanych warunkach wynosił od 14,28 do 43,96%, w zależności od leku i warunków. W tym miejscu również zabrakło mi informacji, jak ustalano czas stresowania oraz odniesienia do tych próbek, gdzie rozpuszczalnikiem była mieszanina wody i acetonitrylu.

Cennym aspektem ocenianej pracy jest zaproponowanie struktur dla wykrytych produktów rozkładu poszczególnych leków. Wykazano, że w przypadku wszystkich badanych leków utlenienie dotyczy przede wszystkim podstawnika w pozycji 7 chinoliny, np. pierścienia piperazyny lub metylopiperazyny. Jednocześnie stwierdzono, że podstawienie układu chinoliny dwoma atomami fluoru w pozycjach 6 i 8 , jak w przypadku lomefloksacyny, zwiększa odporność na utlenianie. Warto także podkreślić, że jedna ze struktur zaproponowana dla produktu rozkładu cyprofloksacyny nie była wcześniej opisana w piśmiennictwie.

Cenną informacją są także wyniki badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej uzyskane metodą bioautografii bezpośredniej, które pokazują że główne produkty rozkładu cyprofloksacyny i pefloksacyny zachowują aktywność przeciwbakteryjną wobec E. coli. Dodatkowo, przy użyciu metod in silico, zbadano potencjalną toksyczność dla wybranych produktów rozkładu. Wykazano, że jeden z produktów rozkładu pefloksacyny może potencjalnie wykazywać działanie mutagenne, rakotwórcze i wpływ na rozrodczość. Tego typu badania łączące budowę chemiczną leków z ich trwałością oraz możliwością generowania produktów rozkładu o nieznanej aktywności biologicznej są niewątpliwie ważne pod względem naukowym, ale mają również potencjał aplikacyjny, przy projektowaniu nowych struktur o pożądanej aktywności.

W dyskusji szczególnie cenne wydaje się wykazanie, że wyniki badań degradacyjnych zależą w dużym stopniu od użytego utleniacza. Jest to szczególnie ważne z uwagi na możliwość wykorzystania takich wniosków przez innych badaczy. Zastosowanie w badaniach stresowych innych utleniaczy niż $H_2O_2$ okazuje się bardzo istotne ze względu na powstawanie różnej liczby produktów degradacji, często

różniących się strukturą w zależności od użytego utleniacza, co wskazuje na ich wielokierunkowe drogi rozkładu.

W dyskusji zwraca uwagę zdolność doktorantki do przejrzystej analizy wyników, wyciągania wniosków i uzasadniania swoich spostrzeżeń. Dyskusja została przeprowadzona poprawnie i uwzględniono w niej wszystkie najważniejsze wątki pracy. Opis jest poprawny, czytelny i przemyślany. Wnioski bezpośrednio wynikają z wyników uzyskanych podczas przeprowadzonych doświadczeń, są czytelnie sformułowane i wnoszą element nowości zarówno do nauki, jak i do praktyki dotyczącej badań nad trwałością substancji leczniczych. Zabrakło mi jedynie wątku dotyczącego wykorzystania otrzymanych wyników w procesie eliminacji fluorochinolonów ze środowiska naturalnego, co było sugerowane we wcześniejszych częściach pracy.

Nieliczne uwagi i/lub sugestie mają charakter dyskusyjny i w żadnym stopniu nie umniejszają osiągnięć Doktorantki. Jestem przekonana, że wszystkie badania zostały wykonane rzetelnie, z możliwie największą starannością. W zakresie edytorskim, praca jest napisana starannie, dobrym językiem, w syntetycznym przejrzystym układzie, jak napisałam powyżej.

Pragnę podkreślić, że oceniana dysertacja wywiera bardzo pozytywne wrażenie. Doktorantka wykazała się niezbędnymi kompetencjami do przeprowadzenia opisanych badań, tj. umiejętnością planowania i przeprowadzania doświadczeń, posługiwania się nowoczesnymi metodami analitycznymi oraz prezentowania wyników swoich badań. Przedstawiona do recenzji praca doktorska wnosi istotne elementy nowości w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, a jednocześnie posiada wyraźny charakter aplikacyjny. Na uwagę zasługuje fakt, że 4 wchodzące w skład cyklu prace zostały opublikowane w czasopismach o znaczącej wartości IF, co potwierdza celowość prowadzenia takich badań i zainteresowanie nimi w środowisku naukowym. Dodatkowo, trzeba podkreślić całkowity dorobek Doktorantki, na który składa się 28 oryginalnych publikacji o łącznej wartości IF 50,069 i 1080 punktów MEiN. Doktorantka była także wykonawcą grantu dotyczącego opracowywania nowych związków aktywnych biologicznie, w którym zajmowała się badaniami trwałości.

Rozprawa mgr Barbary Żuromskiej-Witek spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 roku poz. 1789 z póź. zm., w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 roku poz. 1669 z póź. zm.). Dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Barbary Żuromskiej-Witek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 04.07.2023

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii Leków
Prof. dr hab. Anna Gumieniczek