



Ocena

dorobku naukowego, monotematycznego cyklu prac, stanowiącego osiągnięcie naukowe pt.: „Wykorzystanie metody chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas w oznaczeniach wybranych metabolitów oraz substancji czynnych leków w matrycach biologicznych”, działalności dydaktycznej oraz organizacyjnej dr n. farm. Joanny Giebułtowicz w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych

Dr n. farm. Joanna Giebułtowicz dyplom magistra farmacji uzyskała 28 czerwca 2005 r. na Wydziale Farmacji Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego na podstawie pracy magisterskiej pt.: „Kultura *in vitro* korzeni normalnych i transformowanych *Platycodon grandiflorum* oraz poszukiwanie saponin w otrzymanym materiale”. Kontynuując badania nad kulturami *in vitro* korzeni *Platycodon Grandiflorum* w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej, równocześnie w ramach studiów doktoranckich w Zakładzie Bioanalizy i Analizy Leków rozpoczęła prace badawcze nad aktywnością dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) w stanach fizjologicznych i wybranych schorzeniach jamy ustnej. Od 2010 r. Habilitantka pracuje w Zakładzie Bioanalizy i Analizy Leków Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, początkowo na stanowisku asystenta naukowo-dydaktycznego, a od 2011 r. do chwili obecnej na stanowisku adiunkta. W ramach programu ERASMUS przed obroną doktoratu dr J. Giebułtowicz odbyła staż szkoleniowy w Uniwersytecie UCLAN w Wielkiej Brytanii. W 2011 r. Rada Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego nadała dr J. Giebułtowicz stopień doktora nauk farmaceutycznych w specjalności biochemia na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: „Aktywność dehydrogenazy aldehydowej klasy trzeciej ALDH3A1 w stanie fizjologicznym oraz nowotworach i torbielach jamy ustnej” (promotor: dr hab. n. farm. Piotr Wroczyński).

Ocena dorobku naukowego

Dr n. farm. Joanna Giebułtowicz jest autorem / współautorem 35 opublikowanych prac, w tym 33 oryginalnych (pierwszy autor w 18 pracach) oraz 2 prac poglądowych. Przed doktoratem opublikowanych było 10 z tych prac, natomiast 25 po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych. W czasopiśmie naukowych, znajdujących się na liście Journal Citation

Report (CRJ) opublikowanych zostało 29 z tych prac. Łączny wskaźnik oddziaływania opublikowanych prac (Impact Factor – IF) wynosi - 65,933, punktacja MNiSzW – 825, liczba cytowań (bez autocytowań) – 74 wg Web of Science TM Core Collection, a indeks Hirscha wg tej samej bazy – 5. Dr J. Giebułtowicz jest ponadto autorem 1 rozdziału w podręczniku („Zastosowanie metod statystycznych w badaniach naukowych” StatSoft, 2012) oraz 65 doniesień zjazdowych (46 na zjazdach międzynarodowych i 19 krajowych), których streszczenia były opublikowane w suplementach czasopism naukowych lub materiałach zjazdowych.

W działalności naukowej dr n. farm. J. Giebułtowicz - poza kontynuacją badań dotyczących kultur *in vitro* korzeni normalnych i transformowanych *Platycodon grandiflorum* oraz wytwarzanych przez nie saponin – wyróżnić można dwa zasadnicze kierunki:

- badania enzymów i oraz substancji uczestniczących w mechanizmach ochrony antyoksydacyjnej w warunkach fizjologicznych jak i różnych schorzeniach
- badania nad oceną stężenia wybranych pierwiastków śladowych, metabolitów oraz substancji czynnych leków w materiałach biologicznych i środowiskowych

Aktywność badawcza Habilitantki w początkowym okresie, ze względu na przygotowywaną rozprawę doktorską, koncentrowała się na zagadnieniach związanych z aktywnością dehydrogenazy aldehydowej (ALDH), a w szczególności jej własnościami antyoksydacyjnymi w ślinie osób zdrowych i z wybranymi chorobami jamy ustnej. Przedmiotem badań była ocena wpływu na aktywność tego enzymu m.in. wieku, diety, palenia tytoniu, czynników stymulujących wypływ śliny, a także niektórych leków. Interesujące obserwacje dotyczyły podwyższonej aktywności ALDH w ślinie w stanach zapalnych w obrębie jamy ustnej jak i związane z niską aktywnością enzymu predyspozycje do zwiększonego ryzyka występowania nowotworów o tej lokalizacji narządowej. Wyniki uzyskane w tych badaniach stanowiły przedmiot rozprawy doktorskiej Kandydatki.

Badania dotyczące ALDH i jej udziału w mechanizmach ochrony antyoksydacyjnej w obrębie jamy ustnej można uznać za impuls dla podjęcia prac nad innymi enzymami (peroksydaza ślinowa, dysmutaza ponadtlekowa) jak i substancjami (kwas moczowy) wykazującymi podobne własności. Wyniki tych badań dały podstawę dla wysunięcia sugestii, że spadek aktywności/stężenia antyoksydantów w ślinie pacjentów z torbielami w obrębie jamy ustnej może być uznany za jeden z czynników sprzyjających rozwojowi nowotworów o takiej lokalizacji narządowej. Ta sugestia znajduje, w jakiejś mierze, potwierdzenie w obserwacjach klinicznych, wskazujących na zwiększone ryzyko rozwoju nowotworów u pacjentów z torbielami zębówopochodnymi. Osobną sferę stanowiły badania nad wpływem cyklu

miesięczkowego i ciąży na aktywności ALDH i innych enzymów uczestniczących w ochronie antyoksydacyjnej. Kontynuacją tej tematyki były również badania nad udziałem w mechanizmach ochrony antyoksydacyjnej innych enzymów i substancji, a m.in. wykazanie podwyższonej aktywności ALDH klasy I oraz transferazy glutationowej w erytrocytach w cukrzycy typu II, jako potencjalnych czynników kompensacyjnych, uaktywnianych w warunkach narażenia na stres oksydacyjny. Te obserwacje były impulsem do badań nad specyficznością substratową otrzymanej przez Habilitantkę rekombinowanej dehydrogenazy aldehydowej. Wyniki badań, oceniających parametry kinetyczne wyznaczone dla różnych aldehydów spotykanych w produktach spożywczych mogą, zdaniem Habilitantki, mieć istotne znaczenie dla profilaktyki żywieniowej. W ścisłym związku z tym kierunkiem badań pozostają również prace dotyczące enzymów antyoksydacyjnych (peroksydaza glutationowa, S-transferaza glutationowa, ALDH) we krwi i możliwością wykorzystania oznaczeń aktywności niektórych z nich w diagnostyce różnicowej białowicy jednojamowej i nowotworów wątroby. Istotne uzupełnienie tego kierunku działalności naukowej Habilitantki przynoszą badania molekularne nad polimorfizmem/mutacjami dehydrogenazy aldehydowej klasy III (ALDH3A1), w aspekcie rozwoju niektórych schorzeń okulistycznych, jak i dotyczące ewentualnego występowania w tkankach również białka ALDH3B2.

Osobny dział w aktywności naukowej dr n. farm. J. Giebułtowicz stanowią badania dotyczące stężenia wybranych metali (żelazo, kadm, selen) w różnych materiałach biologicznych i ich ewentualnego wpływu na rośliny, czy nad zawartością wolnych aminokwasów w osoczu pacjentów po przeszczepach wątroby. Do tej grupy zaliczyć można badania stężenia p-krezolu w płynach ustrojowych, znajdujące wykorzystanie w diagnostyce niewydolności nerek, jak i badania dotyczące substancji czynnych takich leków jak środki antydepresyjne, leki beta-adrenolityczne: bisoprololu, metoprololu, propranololu oraz ich metabolitów. Do tej grupy zaliczyć należy również nader interesującą koncepcję badań obecności tych analitów w wodach powierzchniowych i osadach dennych.

Odnosząc się z pełnym uznaniem do dorobku naukowego Habilitantki należy zwrócić uwagę na bardzo konsekwentne rozwijanie tematyki badawczej, systematyczne poszerzenie zakresu badań. Wyniki badań dr n. farm. J. Giebułtowicz mają nie tylko wartość poznawczą, ale w szeregu przypadków wyraźny aspekt użyteczny, wnoszą wiele istotnych informacji dla praktyki klinicznej, jak i ochrony środowiska. Na szczególne podkreślenie zasługuje warsztat badawczy, wykorzystanie szerokiego wachlarza metod chromatograficznych a zwłaszcza technik LC-MS/MS w analizie próbek biologicznych i środowiskowych, jak i umiejętności walidacji wdrażanych metod i analizy statystycznej uzyskiwanych wyników.

Osiągnięcie naukowe

Osiągnięcie naukowe w rozumieniu przepisów art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 12 marca 2003 r. (Dz.U. Nr 65 poz. 595 z póź. zm) stanowi monotematyczny cykl 7 prac, pt.: „Wykorzystanie metody chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas w oznaczeniach wybranych metabolitów oraz substancji czynnych leków w matrycach biologicznych”. Łączny wskaźnik oddziaływania tych prac (IF) wynosi 25,289, a punktacja MNiSzW – 265. Dr n. farm. Joanna Giebułtowicz w 5 z tych pracach jest pierwszym autorem (w 6 autorem korespondencyjnym), a swój udział w ich przygotowaniu oceniała na 40 - 60%. Już tytuł prezentowanego osiągnięcia naukowego w sposób bardzo wyraźny eksponuje element technologii pomiarowej - chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) wykorzystanej w badaniach, których wyniki są przedmiotem wszystkich prac zaliczonych do tego cyklu. Nie jest to technika stosowana powszechnie w rutynowej praktyce laboratoryjnej. Ma na to wpływ nie tylko relatywnie wysoki koszt aparatury pomiarowej jak i stosowanych odczynników o wysokim stopniu czystości, ale również złożoność procedur preparatyki wstępnej próbek m.in. dla minimalizacji efektu matrycowego. Jednak należy podkreślić, że LC-MS/MS jest metodą analityczną pozwalającą w sposób wysoce wiarygodny oznaczać składniki występujące w śladowych ilościach w materiale biologicznym.

Prace zaliczone do tego monotematycznego cyklu dotyczą opracowania metod oznaczania wybranych metabolitów oraz substancji czynnych leków w matrycach biologicznych z wykorzystaniem technik chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) i Habilitantka zastosowała ją w badaniach:

- kwasu 2-aminotiazolino-4-karboksyłowego w homogenatach tkanek lub krwi pełnej pobranych *post mortem* jako markera w diagnostyce zatruc cyjankami
- siarczanu p-krezolu i siarczanu indoksyłu w ślinie jako markerów w diagnostyce niewydolności nerek
- bisoprololu - antagonisty receptorów beta 1 w osoczu i surowicy krwi
- anatazolinu - agonisty receptora histaminowego H1 w diagnostyce i monitorowaniu leczenia napadowego migotania przedsionków

W kolejnych pracach przedstawiono problemy związane z wyborem: materiału biologicznego w jakim wykonywano badania a także z doбором właściwego markera, optymalnej techniki ekstrakcji analitu, walidacji metody pomiarowej zgodnie z wytycznymi Agencji Żywności i Leków (FDA) i Europejskiej Agencji ds. Leków (EMA) oraz weryfikacji możliwości

zastosowania opracowanej metody LC-MS/MS dla próbek rzeczywistych, łącznie z uwzględnieniem warunków wykorzystania w celach praktycznych.

Jakkolwiek znanych jest szereg metod oznaczania stężenia cyjanków we krwi, to brak jest m.in. informacji odnośnie wpływu czasu i warunków fizyko-chemicznych przechowywania próbek do badań na mierzone stężenie analitu. Zwraca się uwagę na różnice w mierzonych stężeniach w zależności od miejsca pobrania krwi, problemy wynikające z lotności cyjanowodoru, czy metabolizmu cyjanków po wchłonięciu do żywego organizmu. Zmiany do jakich może dochodzić w materiałach pobieranych *post mortem* ograniczają możliwości uzyskania wiarygodnych wyników. Za jeden z wiarygodnych markerów narażenia na cyjanki uznawany jest kwas 2-aminotiazolino-4-karboksylowy (ACTA), będący wyłącznie produktem metabolizmu cyjanków w organizmie i cechujący się relatywnie wysoką stabilnością w materiale biologicznym. Przy opracowaniu metody LC-MS/MS oznaczania stężenia ATCA w krwi pełnej pobranej *post mortem* koniecznym był wybór metod i warunków ekstrakcji markera. W tym celu dokonano porównania metody opartej na derywatywacji i ekstrakcji zanieczyszczeń z metodą opartą na ekstrakcji do fazy stałej (polimery z odciskiem molekularnym). Akceptacja pierwszej z tych metod wiązała się z problemem wyboru odczynnika do derywatywacji – porównano użyteczności chlorku 5-(N,N-dimetyloamino)naftaleno-1-sulfonylu (DNSCI) z estru 2-hydroksymetylowego kwasu (S) 2-N-(4-nitrofenoksyukarbonylo) amino-3-fenylpropanowego (S-NIFE), a także właściwego rozpuszczalnika (heksan, czy chlorek etylu). Na każdym z etapów działań prowadzących do opracowania metody LC-MS/MS koniecznym było przeprowadzenie badań weryfikujących użyteczność wybranych metod oraz ich walidacja. W ten sposób opracowana metoda analityczna oznaczania stężenia cyjanków w materiale biologicznym wymagała ostatecznej walidacji, obejmującej analizę powtarzalności i odtwarzalności, dokładności, efektu matrycowego i stabilności. Przydatność tak opracowanej metody do diagnostyki zatruc cyjankami została potwierdzona w badaniach próbek pobranych od 44 osób zmarłych, a także we krwi i tkankach u 33 osób potencjalnie narażonych na cyjanki – ofiary pożarów i osoby zatrute drogą doustną. Dalsze badania nad ATCA wykazały w pewnej mierze ograniczoną jego przydatność jako markera zatrucia cyjankami w warunkach, gdy ich stężenie jest niższe od 3 µg/ml. Weryfikacja tej obserwacji wymagać będzie - wg opinii Habilitantki – dalszych, wielośrodkowych badań na modelu ludzkim.

Siarczan p-krezolu i siarczan indoksyli, zaliczane do grupy toksyn mocznicowych, należą do substancji, które w osoczu występują w blisko 90% w formie związanej z białkami i w warunkach fizjologicznych są eliminowane przez nerki. Przyjmuje się że wzrost ich stężenia we krwi jest wykładnikiem progresji zaburzeń czynności nerek i wiąże się ze wzrastającym

ryzykiem powikłań sercowo-naczyniowych. Ocenie zmian stężenia tych związków przypisuje się istotną wartość w monitorowaniu progresji niewydolności nerek. Interesującym elementem prezentowanych badań była weryfikacja możliwości wykonywania oznaczeń metodą LC-MS/MS tych substancji nie tylko w surowicy krwi, ale również w ślinie, jako matrycy o znacznie mniejszych wymaganiach odnośnie preparatyki wstępnej materiału biologicznego. Wykazano istotną korelację pomiędzy stężeniem siarczanu p-krezolu oraz siarczanu – indoksyłu w ślinie i stężeniem ich frakcji wolnej w osoczu u chorych z niewydolnością nerek.

Kolejna praca tego cyklu dotyczy opracowania metody LC-MS/MS dla badań nad stężeniem bisoprololu – selektywnego antagonisty receptorów β_1 – w osoczu lub surowicy. Jakkolwiek opisanych zostało kilka metod oznaczania tej substancji z wykorzystaniem metody LC-MS/MS, to pewne problemy stwarza etap preparatyki wstępnej, wytrącenia białek. Dr J. Giebułtowicz podjęła próbę zastosowania ekstrakcji w punkcie zmętnienia (CPE) z użyciem Triton X-114 jako detergenta. Walidacja metody CPE-LC-MS/MS wykazała wysoką zgodność uzyskiwanych wyników z opracowaną wcześniej przez Instytut Farmaceutyczny metodą LLE-LC-MS/MS z zastosowaniem ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi. Wyniki tych badań stanowią pierwsze potwierdzenie możliwości zastosowania metody ekstrakcji w punkcie zmętnienia (CPE) w analizie farmaceutyków metodą LC-MS/MS z jonizacją ESI.

Ostatnia z zaliczonych do monotematycznego cyklu prac dotyczy opracowania metody LC-MS/MS dla oznaczania stężenia antazoliny, pochodnej etylenodiaminy należącej do agonistów receptora histaminowego H1 pierwszej generacji. Choć antazolina jest szeroko stosowana w praktyce klinicznej brak było danych dotyczących farmakokinetyki podania tego leku człowiekowi, a jedyną dostępną metodę oznaczania jej stężenia w osoczu (ekstrakcja ciecz-ciecz i analiza HPLC-UV) cechuje relatywnie niska czułość i selektywność. Opracowanie metody CPE-LC-MS/MS dla oznaczania stężenia antazoliny wymagało od Habilitantki weryfikacji szeregu etapów a m.in. wykonania widma MS/MS antazoliny i związków mogących być użyte jako wzorce wewnętrzne tj. fenacytyny, ksylometazoliny i oksydymetazoliny, opracowania metody HPLC, wyboru optymalnego wzorca wewnętrznego, opracowania metody CPE dla izolacji antazoliny z osocza. Na każdym z wymienionych etapów konieczna była walidacja opracowanych metod. Badania z wykorzystaniem metody LC-MS/MS oznaczania stężenia antazoliny przeprowadzone u 10 zdrowych ochotników pozwoliły na wyznaczenie szeregu parametrów farmakokinetycznych (m.in. stężenie początkowe, biologiczny okres półtrwania, objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym, klirens substancji). Obecnie Zespół Kliniki Kardiologicznej CMKP prowadzi w oparciu o tę

metodę badania związane z wpływem antazoliny na właściwości elektrofizjologiczne i parametry hemodynamiczne u ludzi w zależności od jej stężenia w osoczu.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że prace zaliczone do monotematycznego cyklu, stanowiącego w rozumieniu obowiązujących przepisów osiągnięcie naukowe, mogące być podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, cechuje wysokiego stopnia jednorodność z punktu widzenia technologii opracowania metody LC-MS/MS dla oznaczania w materiale biologicznym stężenia wybranych metabolitów oraz substancji czynnych leków. Decydujące znaczenie dla wiarygodności wyników badań z zastosowaniem opracowanych metod LC-MS/MS ma wybór i walidacja metod wykorzystywanych na poszczególnych etapach preparatyki wstępnej, dotyczy to m.in. metod izolacji analitów, analizy użyteczności materiał biologicznego i zasad jego oczyszczania, właściwej selekcja wzorców roboczych. Na pełne uznanie zasługuje również konsekwentna walidacja i weryfikacja wszystkich metod zastosowanych na każdym kroku przygotowywania finalnej procedury badawczej. Dobór publikacji zaliczonych do monotematycznego cyklu prac daje przegląd potencjalnych możliwości wykorzystania metody LC-MS/MS w diagnostyce laboratoryjnej różnych metabolitów jak substancji czynnych szeregu leków, dokumentuje możliwości znacznego poszerzenia panelu badań diagnostycznych i z dziedziny farmakokinetyki leków, których wyniki mogą znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej.

Dorobek dydaktyczny

Z racji miejsca pracy i zajmowanego stanowiska asystenta, a następnie adiunkta naukowo-dydaktycznego dr n. farm. Joanna Giebułtowicz bierze czynny udział w zajęciach dla studentów Wydziału Farmaceutycznego. Ponadto prowadzi projekty naukowe ze studentami Studenckiego Koła Naukowego Analityki Medycznej DIAGMED przy Katedrze Biochemii i Chemii Klinicznej Wydziału Farmaceutycznego WUM, a także opiekowała się 8 mini-grantami studenckimi. Była opiekunem 24 oraz promotorem 9 prac magisterskich. W 4 przewodach doktorskich powierzono Jej funkcję promotora pomocniczego. W 2013 uczestniczyła w pracach nad projektem Q: Kultura Jakości Uczelni. Rozwój systemu zarządzania jakością kształcenia w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym.

Dorobek organizacyjny i kompetencje zawodowo-naukowe

Dr n. farm. J. Giebułtowicz jest od 2012 r. członkiem Wydziałowego Zespołu ds. Jakości Kształcenia (2 kadencja), w latach 2012 – 2016 była członkiem Senackiej Komisji ds. Rozwoju Kadry, a od 2014 r. jest członkiem Wydziałowej Komisji ds. Projektów Młodych Naukowców i Mini-grantów.

W latach 2012 – 2015 dr n. farm była Głównym Wykonawcą grantu uzyskanego w konkursie OPUS2 NCN (2011/03/B/N27/00751), a w latach 2013 i 2014 realizatorem dwóch grantów statutowych (PW27/N/13 i PW27/N/14)

Za dokonania naukowe dr n. farm. J. Giebułtowicz czterokrotnie została uhonorowana nagrodą JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Wyrazem uznania dla wiedzy fachowej było powierzanie Jej przez redakcje renomowanych czasopism naukowych z listy filadelfijskiej funkcji recenzenta 17 prac naukowych.

Odnosząc się z pełnym uznaniem do kompetencji zawodowo-naukowych Habilitantki jak i działalności organizacyjnej można jedynie wyrazić pewien żal, że nie jest członkiem żadnego towarzystwa naukowego. Przepuszczalnie wiedza i doświadczenia dr n. farm. J. Giebułtowicz wnieść wiele nowych treści do działalności tych organizacji.

Wniosek końcowy

Wniosek końcowy sformułowano w oparciu o kryteria oceny ujęte w rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 września 2011 r. w sprawie kryteriów oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego (Dz. U. Nr 196, poz. 1165). Zarówno cykl prac stanowiących osiągnięcie naukowe, jak i cały dorobek naukowy dr n. med. Joanny Giebułtowicz, a także kompetencje zawodowe oraz osiągnięcia dydaktyczne i organizacyjne, spełniają wymogi stawiane w przewodzie habilitacyjnym. W związku z powyższym przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie dr n. farm. Joanny Giebułtowicz do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Kraków, 2017.06.15

Z-CA DYREKTORA ODDZIAŁU
ds. Naukowych
Centrum Onkologii Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie
Oddział w Krakowie
Prof. dr hab. n. med. Jan Kulpa