



## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Piotra Garbackiego  
pt. „Wpływ sterylizacji radiacyjnej na trwałość wybranych cefalosporyn”

Przedstawiona do recenzji praca została wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Promotorem pracy jest prof. zw. dr hab. Anna Jelińska.

Odpowiednia jakość gotowej postaci leku jest podstawowym wymogiem dopuszczenia leków do obrotu. Dla preparatów które stosuje się pozajelitowo, leków ocznych czy antybiotyków dodatkowym wymaganiem jest jałowość. Odnosi się ona do otrzymania preparatu pozbawionego bakterii, grzybów, pierwotniaków i wirusów oraz ich form przetrwalnikowych. W tym celu produkt należy poddać sterylizacji co jest bardzo często znaczącym utrudnieniem w procesie produkcyjnym. W zależności od wielu czynników, można stosować do tego celu różne metody fizyczne, chemiczne czy mechaniczne. Do jednej z metod powszechnie stosowanych należy metoda radiacyjna - zwłaszcza jeśli chodzi o wyroby medyczne. Jednak coraz częściej tą metodą próbuje się wyjaławiać leki np. termolabilne. Dotyczy to zarówno tzw. klasycznych leków w postaci iniekcji czy tabletek, jak i nowoczesnych form leków opartych na nanotechnologii chodzi tu przede wszystkim o mikrosfery, nanosfery, mikroemulsje czy systemy liposomalne. Ograniczeniem metody jest niebezpieczeństwo uszkodzenia leku, przede wszystkim powstanie wolnych rodników, zapoczątkowujących reakcje łańcuchowe prowadzące między innymi do rozkładu substancji leczniczej. Charakter zmian zależy od struktury leku, wielkości dawki i rodzaju stosowanego promieniowania jonizującego. Podjęcie przez mgr Piotra Garbackiego tematu oceny możliwości sterylizacji radiacyjnej cefalosporyn uważam za szczególnie uzasadnione i cenne, z punktu zarówno poznawczego jak i wartości aplikacyjnych. Recenzowana praca przedstawia komplet badań analitycznych mogących posłużyć do określenia trwałości radiochemicznej cefalosporyn oraz ocenę możliwości stosowania sterylizacji radiacyjnej do ich wyjaławiania.

Oceniana praca doktorska ma układ typowy dla tego rodzaju prac i jest przedstawiona na 137 stronach, zawiera 57 rycin oraz 27 tabel. Piśmiennictwo zawiera 104 trafnie dobranych pozycji. W znacznej części są to publikacje opublikowane w ostatnich latach, znajdują się tam również odnośniki do stron internetowych, pozycje książkowe oraz dokumenty międzynarodowych instytucji zajmujących się medycyną nuklearną i farmacją.

Praca zaczyna się wstępem, w którym Doktorant zwraca uwagę jak duże znaczenie ma odpowiednia jakość i trwałość leków dla skutecznej farmakoterapii. Doktorant skupił się na jednym z parametrów, który jest powiązany z lekami ocznymi, iniekcjami, preparatami do żywienia parenteralnego czy lekami zawierającymi antybiotyki – sterylizacją. Przedstawione przez Doktoranta zasady sterylizacji dotyczące substancji biologicznie czynnych jak i substancji

pomocniczych podczas przygotowywania gotowej postaci leku świadczą o dogłębnej analizie dostępnego piśmiennictwa i dużej wiedzy Doktoranta w tym zakresie. Dowodem tego jest opisanie zasad i wytycznych dotyczących sterylizacji promieniowaniem jonizującym produktów stosowanych w medycynie i farmacji. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że Doktorant zauważa nie tylko zalety sterylizacji promieniami gamma, ale również odnosi się do ograniczeń tego procesu.

Część teoretyczną pracy Doktorant rozpoczyna od historycznego opisu odkrycia antybiotyków cefalosporynowych. Następnie precyzyjnie i dokładnie zostaje opisana budowa chemiczna tej grupy leków, ich podział i ich mechanizm działania. Warto zwrócić uwagę, że szczegółowo jest przedstawiona zależność pomiędzy strukturą, a aktywnością tej grupy leków co stanowi podstawę w projektowaniu nowych substancji biologicznie czynnych. Następnie Doktorant zamieścił charakterystykę wybranych antybiotyków cefalosporynowych (które w części praktycznej poddał analizie) uwzględniając zarówno podstawowe informacje o strukturze tych związków jak i informacje o farmakokinetyce i ich trwałości.

Cel Pracy został określony zwięźle i przejrzysto. Było nim określenie wpływu promieniowania jonizującego jako metody sterylizacji na trwałość wybranych antybiotyków cefalosporynowych oraz możliwości zastosowania jej w praktyce. Doktorant planował osiągnąć to poprzez wykorzystanie metod bezpośrednich i pośrednich, które wymagały dodatkowych zabiegów podczas przygotowania próbki do analizy.

Część praktyczna pracy doktorskiej została podzielona na dwie części: Część Doświadczalną oraz Wyniki. Autor rozpoczyna opis od przedstawienia metod i metodyki badań według, której prowadził analizy. Badane antybiotyki po działaniu promieniowania jonizującego zostały zbadane przede wszystkim pod względem trwałości w różnych dawkach - począwszy od 25 kGy (standardowa dawka sterylizacji zgodna z normą EN 552) aż do 400 kGy.

Część doświadczalną Doktorant rozpoczął oczywiście od przygotowania próbek i poddał je działaniu promieniowania jonizującego. Jako pierwsze analizy zostały wykonane: analiza wagowa oraz analiza organoleptyczna. Wykazano, że pod wpływem promieniowania jonizującego nie powstają żadne związki lotne. Zaobserwowano zmianę zabarwienia spowodowaną prawdopodobnie powstaniem barwnych produktów rozkładu. Istotne wydaje się, że Doktorant sprawdził rozpuszczalność substancji i kolor roztworu po rozpuszczeniu. Przewidując w ten sposób możliwość powstania substancji niejednorodnej w całym procesie. Wykazano w ten sposób, że najmniej podatną substancją na radiolizę jest chlorowodorek cefetametu piwoksylu (ale tylko do dawki 100 kGy). Kolejną analizą, jaką wykonał Doktorant było sprawdzenie obecności wolnych rodników po procesie sterylizacją. I próba wytłumaczenia dlaczego w preparacie cefepimu powstaje ich najwięcej (ze względu na obecność substancji pomocniczej L-argininy). Problematyczne jest jednak określenie ilości wolnych rodników dla preparatu Maxipime jako stałej wartości ze względu na to, iż sam producent Bristol-Myers Squibb określa zawartość cefepimu w karcie charakterystyki produktu leczniczego w granicach 90-115 %, a L-alginina dodawana jest do produktu w celu utrzymania odpowiedniego pH. Godne uwagi jest to, że Doktorant ocenił również czas zaniku wolnych rodników w próbce. Najkrótszy czas życia wolnych rodników stwierdzono dla preparatu Maxipime (2 dni) natomiast najdłuższy dla siarczanu cefoseliny - prawie 26 dni. Zarówno krótki czas obecności wolnych



rodników jak i duża ich liczba wskazuje iż może być to spowodowane obecnością wody i L-argininy w gotowej postaci leku.

Ponadto doktorant wykonał analizę spektroskopową napromieniowanych próbek antybiotyków. Wykorzystał do tego metodę Ramana oraz metodę IR. Dzięki temu wyjaśnił mechanizm rozpadu cefalosporyn jak i mechanizm powstawania prawdopodobnych produktów ubocznych sterylizacji - radiolizy. Wykonał to na podstawie obserwacji przesunięć pasm na widmach dla poszczególnych grup funkcyjnych w strukturze związków.

W dalszych etapach analizy dla substancji, których krzywe posiadały co najmniej jeden endotermiczny pik topnienia, została wykonana różnicowa kalorymetria skaningowa. W badanych próbkach zaobserwowano obniżenie temperatury topnienia. Zmiana ta była proporcjonalna do zastosowanej dawki promieniowania jonizującego i może być ona spowodowana powstawaniem produktów radiolizy. Z tego względu metoda ta może być wykorzystana do monitorowania zmian czystości substancji leczniczych poddanych sterylizacji radiacyjnej. Do analizy napromieniowanych próbek użyto również mikroskopu elektronowego oraz proszkowej dyfraktometrii rentgenowskiej. Umożliwiło to określenie formy, w jakiej znajdują się substancje po sterylizacji radiacyjnej w określonej dawce. Zaobserwowano, że dla form krystalicznych zmienia się wielkość kryształów i ich skupisk, w przypadku cefalosporyn występujących w formie amorficznej (cefepim, cefetamet) nie zaobserwowano zmian.

Z punktu widzenia skuteczności sterylizacji radiacyjnej najistotniejsze były dwie analizy opisane na końcu rozdziału czyli badania mikrobiologiczne i analiza HPLC. Aby wykazać otrzymanie jałowego produktu porównano skuteczność sterylizacji metodą sączenia i metodą radiacyjną. Jako szczepów wzorcowych użyto szczepy *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. Wykazano, że sterylizacja metodą radiacyjną jest równie skuteczna co klasyczna metoda sterylizacji jaką jest metoda sączenia. Jedynym wyjątkiem jest siarczan cefoseliny dla którego MIC wzrosła dwukrotnie ale tylko dla szczepu *Escherichia coli*.

Ostatnim etapem badań było wykorzystanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej do oceny zawartości badanych substancji przed i po napromieniowaniu oraz do określenia stałych szybkości reakcji rozpadu. W wyniku analiz wykazano że metoda ta jest selektywna, liniowa, precyzyjna w badanym zakresie stężeń i może być z powodzeniem stosowana do oceny stopnia rozkładu badanych związków. Analizy wykonano dla substancji po standardowym napromieniowaniu w dawce 25 kGy. Stwierdzono, że nastąpił spadek zawartości wszystkich substancji w próbkach po zastosowaniu tej dawki promieniowania, a na chromatografach pojawiły się nowe piki pochodzące prawdopodobnie od produktów rozkładu. Najbardziej wrażliwy na promieniowanie w tej dawce okazał się diastreoizomer A cefuroksymu aksetylu amorficznego oraz siarczan cefkwinomu. Co ciekawe, w przypadku innych cefalosporyn nie stwierdzono korelacji pomiędzy spadkiem zawartości a zastosowaną dawką promieniowania. Metodą tą określono również parametry kinetyczne reakcji rozkładu badanych substancji. Doktorant wykazał że dla cefalosporyn radiodegeneracja zachodzi z kinetyką I rzędu co można wykorzystać w dalszych badaniach.

Należy stwierdzić, że wnioski jakie wysunął mgr Piotr Garbacki są niezwykle istotne pod względem potencjalnego wykorzystania sterylizacji radiacyjnej w procesie produkcyjnym.



Tak jak wykazał Doktorant nie wszystkie substancje można w ten sposób wyjaławiać. Ponadto spodziewać się można powstawania wolnych rodników (które ulegają wygaszeniu w określonym czasie), zmiany barwy czy wręcz spadku zawartości substancji leczniczej na skutek rozpadu. Finalnie z sześciu przebadanych cefalosporyn jedynie ceftiofur sodowy może być sterylizowany radiacyjnie. Świadczy to o złożoności problemu i zagrożeniu jakie pociąga za sobą promieniowanie jonizujące. Dlatego problem sterylizacji promieniowaniem jonizującym jest nie tylko ciekawy ale również istotny pod względem bezpieczeństwa jego wykorzystania.

Jako recenzent chciałbym przedstawić kilka uwag, komentarzy i pytań:

-Doktorant użył do badań pięciu czystych substancji leczniczych i jednego gotowego preparatu - Maxipime. W przypadku preparatu Maxipime interesujące i wskazane wydaje się uzupełnić badania o porównanie wyników sterylizacji czystej substancji i produktu leczniczego;

-Na jakiej podstawie doktorant określił zawartość cefepimu na ponad 99%, jeśli producent w karcie charakterystyki podaje zawartość 90-115 % i nie określa tego dokładnie;

-W rozdziale „Metodyka badań” nie znalazłem wielkości porów sączków użytych do sterylizacji metodą sączenia;

-Czym kierował się doktorant wybierając metodę UHPLC do analizy chlorowodoru cefetametum piwoksylu skoro w większości działów kontroli jakości firm farmaceutycznych znajdują się aparaty HPLC, a UHPLC jest rzadkością;

-W pracy nazwy szczepów bakterii pisane są pełną nazwą dwuczłonową lub skrótem, sugerowałbym ujednoczyć zapis, bądź przyjąć, że pierwszy raz piszemy pełną nazwę a następnie używamy skrótu;

-Pomocne byłoby umieszczenie indeksu skrótów, zwłaszcza gdy przy opisie analitycznym stosowane są skróty nazw substancji.

Podsumowując, pracę oceniam bardzo wysoko zarówno pod względem edytorskim jak i merytorycznym. Przedstawiony zakres badań wskazuje na wybitne opanowanie warsztatu badawczego przez doktoranta oraz umiejętność wielopłaszczyznowego podejścia do analizy leków. Doktorant podejmując pracę nad wykorzystaniem promieniowania jonizującego do sterylizacji postawił znaczący krok w kierunku rozwoju nowoczesnej radiofarmacji w Polsce. Ponadto wyniki badań zostały opublikowane w trzech pracach oryginalnych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej gdzie Doktorant jest pierwszym autorem. Tym samym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Piotra Garbackiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnioskuję o wyróżnienie pracy.

KIEROWNIK  
Pracowni Radiofarmacji  
Zakładu Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji  
Katedry Chemii Farmaceutycznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
  
Dr hab. n. farm. prof. UM Paweł Szymański