



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM

Kraków, 17 maja 2019

## **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**Pana mgr chem. Jakuba Dzitko**

pt.: „Badanie układów: proleków wybranych analogów  $\beta$ -laktamowych z substancjami pomocniczymi pod kątem możliwości modyfikacji szybkości rozpuszczania, trwałości, przenikalności i aktywności mikrobiologicznej”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. farm. Judyty Cieleckiej-Piontek  
w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

W ostatnich latach obserwuje się gwałtowny rozwój medycyny i chemii medycznej. Współczesne badania nad nowymi strategiami w farmakoterapii stały się wiodącym nurtem badań w projektowaniu proleków, które stanowią obecnie szeroką grupę preparatów farmaceutycznych. Wprowadzenie ich do terapii doprowadziło w konsekwencji do poprawy parametrów farmakokinetycznych, indeksu terapeutycznego i skuteczności działania leku macierzystego. Cele te są realizowane poprzez wpływ na stabilność substancji czynnej, przepuszczalność przez błony umożliwiające wnikanie proleku do struktur, z którymi oddziałuje, czy zmianę rozpuszczalności w środowisku wodnym (dystrybucja leku). Skuteczny terapeutycznie lek powinien trafiać i działać dokładnie w miejscu schorzenia, dlatego też prowadzone są modyfikacje znanych substancji czynnych, prowadzące do zwiększenia ich właściwości leczniczych (fizykochemiczne tj. trwałość, rozpuszczalność; farmakologiczne tj. ryzyko interakcji, biodostępność) lub/i polepszające ich cechy organoleptyczne (smak, zapach).

W świetle istniejącego stanu wiedzy nt. proleków i nowych strategii w terapii należy zwrócić uwagę na znaczenie badań preformulacyjnych, wykazujących duży potencjał w zwiększeniu efektywności farmakoterapii substancjami o działaniu biologicznym i w konsekwencji otrzymania leków o większej efektywności czy większym bezpieczeństwie stosowania.



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr chem. Jakuba Dzitko wpisuje się w aktualny trend badań i koncentruje się nad analizą układów proleków wybranych analogów  $\beta$ -laktamowych z substancjami pomocniczymi, pod kątem możliwości modyfikacji ich właściwości fizykochemicznych i aktywności mikrobiologicznej.

Recenzowana dysertacja ma układ typowy dla tego rodzaju prac i stanowi spójne tematycznie opracowanie; liczy łącznie 103 strony i zawiera 27 rysunków, 15 tabel oraz 15 wykresów. Piśmiennictwo obejmuje 143 trafnie dobranych pozycji. W znacznej części są to prace opublikowane w ostatnich latach.

Praca rozpoczyna się Wstępem, w którym Doktorant zwraca uwagę jak duże znaczenie dla skutecznej farmakoterapii mają proleki, zwłaszcza w odniesieniu do substancji czynnych, dla których niezwykle istotna jest modyfikacja właściwości fizykochemicznych, obok organoleptycznych. Analizując aktualne wyzwania i ograniczenia związane z rozwojem proleków z grupy analogów  $\beta$ -laktamowych, Doktorant zwrócił uwagę na modyfikacje analogów  $\beta$ -laktamowych w odniesieniu do ich właściwości preformulacyjnych, jako implikacji ich potencjalnego oddziaływania z wybranymi substancjami pomocniczymi. Ta część pracy napisana została w sposób jasny i staranny.

Literatura omawianych zagadnień zawarta w kolejnej części rozprawy została adekwatnie do danej tematyki dobrana i odzwierciedla aktualny stan wiedzy w zakresie omawianych przez Doktoranta zagadnień.

Autor precyzyjnie i dokładnie opisał podział oraz przeprowadził charakterystykę analogów  $\beta$ -laktamowych z uwzględnieniem ich trwałości chemicznej w aspekcie ograniczenia zastosowania. Warto zwrócić uwagę, że szczegółowo przedstawiona została zależność między strukturą, właściwościami fizykochemicznymi i aktywnością przeciwbakteryjną omawianych analogów, co stanowi podstawę do podjęcia wyzwań w poszukiwaniu nowych alternatyw w farmakoterapii. Następnie Doktorant zamieścił charakterystykę wybranych proleków, które w dalszej, eksperymentalnej części pracy poddał szczegółowej analizie. uwzględniając zarówno podstawowe informacje o strukturze tych związków jak i informacje o ich farmakokinetyce i trwałości. Omówił szczegółowo dostępne literaturowe dane dotyczące badań trwałości pochodnych analogów  $\beta$ -laktamowych wskazując na złożoność zjawiska ich rozkładu (w aspekcie stężeń wyjściowych, działających czynników



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM

fizykochemicznych czy współobecności innych substancji np. pomocniczych), oraz szczegółowo przedstawił zależności pomiędzy strukturą a mechanizmem rozkładu.

Biorąc pod uwagę ograniczenia stosowania proleków, w tym objętych planem badań antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, Autor w sposób niezwykle wyczerpujący przybliżył znaczenie badań preformulacyjnych i uzasadnił celowość podjętego w dalszej pracy wysiłku badawczego, dotyczącego modyfikacji właściwości fizykochemicznych uzyskanych układów obejmujących parametry tj. rozpuszczalność, biodostępność, trwałość, wzrost aktywności przeciwbakteryjnej, minimalizowanie działań niepożądanych, czy organoleptyczne (maskowanie smaku, zapachu). Szczególną uwagę zwrócił na badania preformulacyjne zmierzające do opracowania innowacyjnych układów dostarczania antybiotyków  $\beta$ -laktamowych.

Następnie mgr Jakub Dzitko dokonał przeglądu metod analitycznych stosowanych w badaniach tożsamości i oznaczania analogów  $\beta$ -laktamowych tj. metody spektrofotometryczne (w tym także spektrofotometria pochodnych), czy techniki obliczeniowe *in silico*, skupiając najwięcej uwagi na najbardziej popularnych technikach chromatograficznych (TLC, HPLC-DAD) z uwzględnieniem warunków rozdziału i sposobów detekcji.

Całość Autor wzbogacił o metody określania wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki, stosowane w ocenie skuteczności substancji aktywnej o działaniu przeciwbakteryjnym, epidemiologii, prognozowaniu efektów leczenia, oraz pozwalające określić charakter jej działania (bakteriobójczego lub bakteriostatycznego). W omówieniu poszczególnych metod zawarł, co niezwykle cenne, zalety i ograniczenia wynikające z użycia każdej z nich, co pozwala na dopasowanie odpowiedniej metody do charakteru prowadzonych oznaczeń.

Cel pracy został określony w sposób zwięzły i przejrzysty. Stanowiło go określenie wpływu substancji pomocniczych (mannitol, hydroksypropylometyloceluloza, skrobia, laktoza jednowodna, poliwinylpirolidon) na wybrane proleki antybiotyków  $\beta$ -laktamowych (piwampicylinę (pochodną penamu), chlorowoderek cefetamet u piwoksylu (pochodną cefemu) oraz tebipenem piwoksyl (pochodną karbapenemu)) w zakresie możliwości modyfikacji szybkości rozpuszczania, trwałości chemicznej, przenikalności przez sztuczne



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM

błony biologiczne i aktywności mikrobiologicznej. Wskazane cele Doktorant planował osiągnąć poprzez wykorzystanie metod, zarówno analitycznych jak i mikrobiologicznych, oraz stosując wielowymiarową metodę Analizy Głównych Składowych (PCA) do analizy uzyskanych danych eksperymentalnych.

Część praktyczna pracy doktorskiej podzielona została na 3 części tj. Część Doświadczalną, Wyniki, Omówienie i Dyskusję Wyników. Autor rozpoczyna opis od przedstawienia zastosowanych technik i metodyki badań, według których prowadził analizy.

Część Doświadczalną Doktorant rozpoczął od opisu przygotowania próbek do badań preformulacyjnych. Następnie przedstawił warunki przeprowadzenia badań tożsamościowych proleków oraz oceny interakcji zachodzących między prolekami a substancjami pomocniczymi, metodą spektroskopii w podczerwieni (FT-IR). Omówił także metodykę prowadzonych analiz, obejmującą badania szybkości rozpuszczania (aparaturę łopatkową), trwałości chemicznej (warunki podwyższonej wilgotności względnej (76,5%), wpływu temperatury (348K) oraz niekontrolowanej wilgotności względnej w podwyższonej temperaturze (363K), przenikalności przez błony biologiczne z wykorzystaniem modelu PAMPA (model równoległej przepuszczalności sztucznej membrany) i GIT (gastrointestinal tract), aktywności przeciwbakteryjnej (metoda studzienkowa) proleków w układach modelowych z wybranymi substancjami pomocniczymi.

Do analizy ilościowej proleków  $\beta$ -laktamowych wykorzystał metody HPLC z detekcją spektrofotometryczną (DAD). Natomiast dla chlorowodorku cefetametu piwoksylu, ze względu na jego dużą nietrwałość, został użyty detektor nanoilościowy (NQAD). Opracowane metody chromatograficzne zostały zwalidowane w aspekcie selektywności, liniowości, precyzji i dokładności zgodnie z wytycznymi dotyczącymi walidacji metod analitycznych (ICH). Wyznaczono również granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) dla badanych analitów.

Do analizy heterogenicznych wyników otrzymanych w szeregu prowadzonych analiz, spektroskopowych, profili rozpuszczania, przepuszczalności i aktywności przeciwbakteryjnej (MIC) wykorzystał metodę PCA, na podstawie której możliwe było wyciągnięcie wniosków i wskazanie zależności pomiędzy analizowanymi zmiennymi.



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM

W rozdziale Wyniki Autor zamieścił uzyskane w trakcie prowadzonych analiz dane dotyczące kolejno badanych antybiotyków w odpowiednich układach preformulacyjnych. Całość dysertacji mgr Jakuba Dzitko zakończona jest 10-cio stronicowym omówieniem wyników połączonym z ich dyskusją, która prowadzona jest obszernie, wyczerpująco i prawidłowo. Doktorant wykazał umiejętność syntetycznej i wyważonej oceny wyników wykonanych badań dotyczących wpływu połączeń proleków  $\beta$ -laktamowych objętych planem badań z substancjami pomocniczymi (mannitol, hydroksypropylometyloceluloza, skrobia przeżelowana, laktoza jednowodna oraz poliwinylpirolidon) na zmiany właściwości fizykochemicznych oraz aktywność przeciwbakteryjną. Uzyskane wyniki Autor przedyskutował z danymi literaturowymi. Przeprowadzone analizy są niezwykle istotne w kontekście planowania rozwoju innowacyjnych formułacji farmaceutycznych.

Sposób napisania Dyskusji wskazuje na dobre przygotowania merytoryczne Doktoranta i jego kompetencje do prowadzenia pracy badawczej.

W wyniku realizacji badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej Autor sformułował siedem wniosków, będących jednoznacznie odpowiedzią na postawione cele pracy. W mojej opinii większość wniosków jest uzasadniona, przy czym punkt pierwszy zaliczyłabym raczej do stwierdzeń ogólnych. Za najbardziej istotny uważam wniosek ostatni, gdzie Doktorant wskazuje na silne modyfikacje aktywności bakteriobójczej opracowanych układów preformulacyjnych proleków  $\beta$ -laktamowych. Krytyczne podejście do badań wskazuje na dużą dojrzałość naukową mgr Jakuba Dzitko.

Kolejne rozdziały pracy stanowią streszczenie (w języku polskim i angielskim), które wyczerpująco przekazuje cele, metodykę, uzyskane wyniki, ich dyskusję i wnioski. Zaproponowane przez Doktoranta badania nad układami proleków wybranych analogów  $\beta$ -laktamowych z substancjami pomocniczymi, pod kątem możliwości modyfikacji ich właściwości fizykochemicznych i aktywności mikrobiologicznej, uważam za uzasadnione i niezwykle przydatne, zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na kilka kwestii:

W treści rozprawy obecne są liczne tzw. „literówki” oraz błędy stylistyczne, np.:

- w Spisie Treści (pkt 10) Spis Rysunków Autor podaje stronę 85, powinna być 87
- „ultrawysokosprawny chromatogram cieczowy” (str. 34) - powinno być chromatograf



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM

- Ryc. 13. Schemat badania aktywności mikrobiologicznej metodą studzienkową - brak pkt.5 (str.39),
- w Tabeli 6. Wyniki dla walidowanych parametrów proleków  $\beta$ -laktamowych - brak wyników dla chlorowodorku tebipenemu piwoksylu (str. 43),
- w Tabeli 6 (str. 43) nazwa detektora NQUAD a tabeli 4 (str. 41 detektor NQAD), podobnie w dyskusji obie wersje nazw stosowane wymiennie,
- „w płynie akceptorowym” - powinno być akceptorowym (str. 47)
- przy prezentacji wyników powtórzono całe akapity, zmienione zostały praktycznie tylko nazwy analizowanych leków, np. Rozdział 5.1.1. (str. 44) identyczny z 5.3.1. (str. 61), analogicznie Rozdział 5.1.2. (str. 47) i 5.2.2. (str. 56) i 5.3.2. (str. 66)
- Rozdział 5.1.3. (str. 49), 5.2.3. (str. 58), 5.3.3. (str. 67) - we wszystkich ww. opisach jest sformułowanie: ” .... W odstępach czasu, określonych przez szybkość degradacji, fiolki usunięto, schłodzono do temperatury pomieszczenia, a ich zawartość rozpuszczono w wodzie destylowanej...”. Prawdopodobnie Autor miał na myśli, „wyjęto”
- Rozdział 5.1.4. (str. 50), 5.2.4. (str. 59) i 5.3.4. (str. 68) są również niemal dosłownym powtórzeniem. Ponadto we wszystkich ww. punktach Autor powołuje się na punkt nr 4.5.6., a taki nie istnieje
- 5.1.5. (str. 50) i 5.2.5. (str. 59) i 5.3.5. (str. 68) - opis jest bardzo podobny lub identyczny pod względem treści, różni się numerami cytowanych tabel czy wykresów, odpowiadających wynikom uzyskanym dla odpowiedniego leku
- w treści pracy stosowane są różne formy zapisu np. „Wykres 13.” i „Wykres. 14” (str. 67)
- różna dokładność podawanego pH płynu akceptorowego pH 2,73, pH 6,20 (pkt 4.4.5 str. 37) lub np. pH 2,730 i pH 6,204 (str. 50 wykres 5 czy w dyskusji, str. 73).
- w Dyskusji Autor pisze: „Należy zaznaczyć, że spadek trwałości chemicznej piwampicyliny w żadnym z badanych układów preformulacyjnych nie wiązał się ze zmianą kinetycznego mechanizmu rozkładu piwampicyliny. We wszystkich układach, obserwowany rozkład przebiegał zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu” (str. 73). Autor w całej pracy nie wspomina o uzyskanych własnych wynikach badań kinetycznych dotyczących badanych układów preformulacyjnych, dyskutowanych w dalszej części pracy (str. 76 i 79)
- w zapisie literatury pojawia się wiele niekonsekwencji i braków np. pozycje 136 i 137 - błędny zapis tytułu czasopisma.



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM

Powyższe uwagi, podobnie jak usterki edytorskie mają charakter interpretacyjny i nie wpływają na ocenę merytoryczną rozprawy.

Rosnąca oporność bakterii na antybiotyki stanowi aktualnie poważany problem kliniczny. Skuteczność leczenia infekcji bakteryjnych antybiotykami  $\beta$ -laktamowymi jest znacznie ograniczona przez niską biodostępność i niestabilność chemiczną. Proleki antybiotyków  $\beta$ -laktamowych stosowane są w celu zmniejszenia tych ograniczeń. Zaprezentowane w pracy korzyści wynikające ze stosowania proleków wybranych analogów antybiotyków  $\beta$ -laktamowych w pełni argumentują obserwowany trend modyfikacji chemicznej, prowadzącej do zwiększenia trwałości i biodostępności, oraz lepszych właściwości organoleptycznych.

Dorobek naukowy Doktoranta, obejmujący łącznie osiem artykułów w czasopismach posiadających Impact Factor (3) i bez IF (5), o sumarycznej wartości IF 7,591 (co odpowiada punktacji MNiSW 100), dodatkowo potwierdza jego przygotowanie do prowadzenia badań naukowych.

Podsumowując, pracę oceniam wysoko, zwłaszcza pod względem merytorycznym. Doktorant w pełni zrealizował założone cele badawcze, a przedstawiony zakres badań wskazuje na dobre opanowanie warsztatu badawczego oraz umiejętność wielopłaszczyznowego podejścia do analizy leków. Uważam, że przedstawiona mi do oceny praca odpowiada warunkom stawianym tego typu opracowaniom na stopień doktora nauk farmaceutycznych. Tym samym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr chem. Jakuba Dzitko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra Chemii Nieorganicznej  
i Analitycznej UJCM

  
dr hab. Monika Dąbrowska  
adiunkt

Dr hab. n. farm. Monika Dąbrowska