



Poznań, 20.05.2019

Dr hab. Michał Zieliński, prof. UAM

Zakład Technologii Chemicznej

E-mail: mardok@amu.edu.pl

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

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

przedstawionej przez **magistra Jakuba Dzitko**

Praca doktorska mgr Jakuba Dzitko ***Badanie układów: proleków wybranych analogów  $\beta$ -laktamowych z substancjami pomocniczymi pod kątem możliwości modyfikacji szybkości rozpuszczania, trwałości, przenikalności i aktywności mikrobiologicznej*** została wykonana w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. n. farm., mgr chem. Judyty Cieleckiej-Piontek. Recenzowana praca nawiązuje do doświadczeń badawczych Promotora i dotyczy bardzo aktualnego i ważnego problemu poznawczego o potencjalnie ogromnym znaczeniu praktycznym.

Antybiotyki  $\beta$ -laktamowe są jednymi z najczęściej stosowanych chemioterapeutyków zarówno podczas leczenia w warunkach domowych, ambulatoryjnych i hospitalizacyjnych. Posiadają one jednak liczne ograniczenia takie jak niska biodostępność i trwałość chemiczna, niekorzystne właściwości fizykochemiczne istotne z punktu prowadzenia badań preformulacyjnych i formulacyjnych oraz specyficzny smak, które mogą zostać wyeliminowane poprzez zastosowanie ich proleków. Zastosowanie proleków umożliwia między innymi przedłużenie działania substancji aktywnej, wzrost przepuszczalności dla leku przez błonę komórkową czy zmianę rozpuszczalności w środowisku wodnym. W konsekwencji, doprowadza to do podniesienia skuteczności terapeutycznej stosowanego preparatu. Dlatego też recenzowana rozprawa, poświęcona prolekom występującym w najważniejszych subgrupach antybiotyków  $\beta$ -laktamowych: pochodnych penamu (piwampicylinę), cefemu (chlorowodrek cefetamet u piwoksylu) i karbapenemu (tebipenem piwoksylu) dobrze odzwierciedla aktualny nurt badań w poszukiwaniu kolejnych grup proleków dla analogów  $\beta$ -laktamowych.

Przedłożona do recenzji praca doktorska posiada klasyczny układ, charakterystyczny dla prac eksperymentalnych i jest opracowaniem liczącym 103 stron, zawierającym 27 rysunków, 15 tabel oraz 15 wykresów - odpowiednie spisy znajdują się na końcu pracy. Tytuł rozprawy został sformułowany poprawnie i odpowiada przedstawionym wynikom badań. Praca podzielona jest na rozdziały - wstęp do pracy (2 strony), przegląd literaturowy (29 stron), cel pracy (strona), zakres i metodyka badań (11 stron), wyniki badań (26 stron) i ich omówienie wraz z dyskusją (10 stron). Całość pracy kończą wnioski (strona), streszczenia w języku polskim i angielskim, oraz bibliografia licząca 143 pozycje literaturowe.

**Część teoretyczna**, poprzedzonym krótkim **wstępem** oparta jest na ponad 100 pozycjach bibliograficznych. W większości są to doniesienia z ostatnich lat, co wskazuje na dużą aktualność problemu badawczego, jaki został zdefiniowany i rozwiązany przez Autora w toku przeprowadzonych eksperymentów. Doktorant w zwięzły sposób przedstawił zagadnienia dotyczące podziału i charakterystyki analogów  $\beta$ -laktamowych. Jest to cenne wprowadzenie z uwagi na to, że w swojej pracy stosował właśnie tego typu antybiotyki  $\beta$ -laktamowe. W części tej Autor odniósł się również do składu formulacji farmaceutycznej, stosowanych substancji pomocniczych, jak również metod analitycznych stosowanych w badaniach tożsamości i oznaczeniu leków.

Reasumując, część literaturowa została przedstawiona w sposób bardzo zwięzłym, przejrzysty i czytelny. To opracowanie stanowi logiczną całość, a Autor wykazała się dobrą znajomością literatury przedmiotu.

**Cel swoich badań** Doktorant przedstawił w kolejnej części pracy. Sprecyzował go w postaci 5 głównych zadań obejmujących:

- badanie tożsamości analizowanych proleków  $\beta$ -laktamowych (piwampicyliny, chlorowodorku cefetametu piwoksyli i tebipenemu piwoksyli);
- preparatykę układów proleków  $\beta$ -laktamowych z wybranymi substancjami pomocniczymi;
- oznaczenie stężeń proleków  $\beta$ -laktamowych w układach binarnych podczas badań szybkości rozpuszczania w płynach akceptorowych, trwałości chemicznej i przenikania przez sztuczne błony biologiczne;
- badanie aktywności mikrobiologicznej układów prolek-substancja pomocnicza;
- analizę statystyczną otrzymanych wyników metodą analizy głównych składowych - PCA.

Szczegółowe zadania badawcze, opisane w **części doświadczalnej**, Doktorant rozpoczyna od wymienienia stosowanych w swoich badaniach substancji aktywnych i pomocniczych, odczynników i aparatury badawczej wykorzystywanej podczas badań. Dalej przedstawia metody badawcze jakie stosował w swojej pracy, a które miały pomóc w osiągnięciu założonych celów badawczych.

**Wyniki badań** są zaprezentowane w postaci rysunków, tabel i wykresów. Ich prezentacji towarzyszy krótki komentarz. Opis uzyskanych rezultatów został poszerzony i skomentowany w **dyskusji wyników**. Prezentację i dyskusję wyników badań podzielono na trzy zasadnicze części dotyczące omówienia poszczególnych analogów  $\beta$ -laktamowych – piwampicyliny, chlorowodoru cefetametu piwoksyli i tebipenemu piwoksyli. Każda z części została zbudowana na tej samej zasadzie a mianowicie najpierw określono badania tożsamości poszczególnych związków w oparciu o badania w podczerwieni (FT-IR), następnie sprawdzono szybkość rozpuszczania po wprowadzeniu do układów preformulacyjnych, określono stabilność chemiczną w mieszaninach preformulacyjnych, przenikalność przez układy sztucznych błon biologicznych, aktywność bakterioobójczą i przeprowadzono analizę głównych składowych w ocenie zależności zmian parametrów fizykochemicznych i makrobiologicznych.

W ostatnim rozdziale poprawnie sformułowano najważniejsze **wnioski** wynikające z przeprowadzonych doświadczeń, choć mam wrażenie że zbyt ogólnie. Końcowe fragmenty części opisowej zawierają streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim i angielskim oraz spis cytowanej literatury.

**Do najważniejszych osiągnięć recenzowanej pracy doktorskiej zaliczam:**

- Opracowanie i preparatykę binarnych układów proleków  $\beta$ -laktamowych z wybranymi substancjami pomocniczymi;
- Przeprowadzenie w jednym laboratorium porównania wpływu substancji pomocniczych (skrobi, mannitolu, hydroksypropylometylocelulozy, laktozy oraz poliwinylpirolidonu) na wybrane proleki antybiotyków  $\beta$ -laktamowych w zakresie modyfikacji szybkości rozpuszczania, trwałości chemicznej, aktywności mikrobiologicznej czy przenikalności przez sztuczne błony biologiczne;
- Wykorzystanie spektroskopii w podczerwieni FT-IR do badań tożsamości poszczególnych analogów  $\beta$ -laktamowych w połączeniu z substancjami pomocniczymi;
- Opracowanie i zwalidowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją za pomocą matrycy diodowej (DAD) i detektora nano-ilościowego (NQAD - Nano Quantity Analyte Detector) w odniesieniu do selektywności, precyzji i dokładności oznaczeń stężeń badanych proleków  $\beta$ -laktamowych;
- Otrzymane wyniki dotyczące oceny szybkości rozpuszczania i przenikania przez błony biologiczne chlorowodoru cefetametu piwoksyli są wynikami pionierskimi i stanowią uzupełnienie literatury przedmiotu w tym właśnie aspekcie.

Wyliczone powyżej zalety pozwalają określić rozprawę mgr Jakuba Dzitko jako dobre i wartościowe studium właściwości fizykochemicznych i mikrobiologicznych wybranych analogów  $\beta$ -laktamowych.

Z obowiązku recenzenta, obok pozytywnych stron recenzowanej rozprawy, muszę zwrócić uwagę na jej pewne niedociągnięcia. Praca nie jest wolna od pewnych uproszczeń, pomyłek oraz błędów, które czasami utrudniają ocenę przedstawionych treści i toku rozumowania Autora. Dotyczą one następujących zagadnień:

1. W części teoretycznej pracy, Doktorant przedstawia czynniki wpływające na dobór składu formulacji farmaceutycznej jak również przedstawił niektóre substancje pomocnicze stosowane w projektowaniu leków. Zabrakło mi jednak wyjaśnienia dlaczego w swojej pracy wykorzystał skrobię, mannitol, hydroksypropylometylocelulozę, laktozę oraz poliwinylpirolidon. Czym kierował się Doktorant w wyborze substancji pomocniczych? Dodatkowo na stronie 71 „Omówienia i dyskusji wyników” Autor wspomina o zastosowaniu stearynianu magnezu jako substancji pomocniczej. Czy z tym związkiem również były prowadzone badania?
2. Mieszaniny badanych proleków  $\beta$ -laktamowych z substancjami pomocniczymi Doktorant przygotował w proporcji 1:1. Czy Autor podejmował próby otrzymania innych stosunków np. 0,5:1 i 1:0,5. Jak zdaniem Doktoranta wpływałoby to na właściwości końcowych układów.
3. W części eksperymentalnej dotyczącej metodyki badań chromatograficznych (rozdział 4.4.7), Autor podaje że oznaczenia stężenia chlorowodoru cefetametu piwoksylu przeprowadził z zastosowaniem detekcji nano-ilościowej (HPLC-NQAD), jednak w rozdziale 5.2.3 przedstawił wyniki analiz dla metody HPLC-DAD, podczas gdy w omówieniu i dyskusji wyników odnosi się do badań HPLC-DAD i HPLC-NQAD. Czy są to dwie niezależne serie danych?
4. Na stronie 35 Autor pisze że otrzymane mieszaniny preformulacyjne przechowywano w atmosferze kontrolowanej wilgotności. Co to za atmosfera – czy jest to atmosfera gazu obojętnego, ile wynosiła wilgotność?
5. Na stronie 49, Autor pisze - „Trwałość mieszanin badano przy podwyższonej wilgotności względnej (76,5%) przy 348K i w suchym powietrzu (0% wilgotności względnej) przy 363K”. Podobnie na stronie 58 i 67. Jednak w części eksperymentalnej w warunkach badania trwałości proleków Doktorant podaje warunki podwyższonej wilgotności względnej (76,5%) i podwyższonej temperatury 348K oraz warunki niekontrolowanej wilgotności względnej (RH = ambient) i podwyższonej temperatury 363K. Czy może Doktorant się ustosunkować do tych warunków?
6. Dyskutując wpływ pH na szybkość rozpuszczania odpowiednich proleków  $\beta$ -laktamowych w obecności substancji pomocniczych Autor podaje że badania te wykonano przy pH wynoszącym 1,2 i 6,8, jednocześnie odsyła do rozdziału 4.4.3 części eksperymentalnej gdzie podaje, że próbki umieszczono w roztworze kwasu solnego o pH wynoszącym 2,1. Proszę Doktoranta o komentarz i wyjaśnienie która wartość jest poprawna.
7. Doktorant stosuje wiele skrótów, których znaczenie pozostaje bardzo często niewyjaśnione w tekście (przykładowo Tabela 1 – skrót AUC, czy opis związków na Ryc. 6). Zdaję sobie sprawę, że niejednokrotnie są to oznaczenia powszechnie używane, niemniej jednak ich znaczenie powinno być jasno zdefiniowane w opracowaniu takim jak rozprawa doktorska.

Dobrym rozwiązaniem byłoby zamieszczenie spisu tych skrótów w oddzielnym rozdziale. Ponadto, zauważyłem niekonsekwencję w stosowaniu jednostek - zamiennie używane są „mol/l” i „mol/L”, „ml” i „mL”, na opisach osi „Absorbancja” i „Absorbancja/Intensywność” czy „°C” i „K” jak również skrótu detektora nano-ilościowego „NQAD” czy „NQUAD” (dotyczy to całej pracy). Zapisy te powinny być ujednoczone.

Co więcej, w rozdziałach 5.1.4, 5.2.4 i 5.3.4 Autor odwołuje się do części eksperymentalnej i pkt 4.5.6. Niestety rozdział taki w pracy nie występuje. Zakładam, że Doktorant miał na myśli podrozdział 4.4.5.

W pracy występuje szereg drobnych błędów jak np:

1. Tabela 4 – w warunkach rozdziału chromatograficznego oznaczania proleków Autor pominął temperaturę kolumny przy oznaczaniu tebipenemu piwoksyli, a w Tabeli 6 nie zamieścił wyników walidacji oznaczeń dla tegoż związku;
2. Na stronie 34 i Tabelach 9 i 12 Autor błędnie podał akronim spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fourier’a, chociaż chciałbym zaznaczyć że taki skrót również powszechnie występuje w literaturze naukowej. Zgodnie ze słownikiem pojęć stosowanych w spektroskopii oscylacyjnej powinno się używać akronimu FT-IR – J.E. Bartie, Glossary of terms used in vibrational spectroscopy, in Handbook of Vibrational Spectroscopy (J.M. Chalmers and P.R. Griffiths, Eds) vol. 3, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2002, pp 3743-3791.
3. Na wykresach 3, 4, 9, 13 i 14 brak opisu osi Y, na rycinie 20 brak zarówno opisu osi X jak i Y na wykresie wewnątrz rysunku, natomiast na wykresie 5 dokładność jednostki jest podana do 5 miejsc po przecinku, podczas gdy na pozostałych wykresach przedstawiających wartość pozornych współczynników przenikalności tylko do jednego miejsca. Na wielu wykresach, jeżeli podane są wartości bezwymiarowe to powinno się stosować skrót jednostek umownych (j.u.) którego często brakuje.
4. Na wykresach 27-32 (widma FT-IR) Autor powinien umieścić widma substancji wyjściowych.
5. Mam również zastrzeżenia co do sposobu cytowania literatury – pozycje [17] i [19] są tymi samymi, choć przy [19] pojawia się dodatkowy tom. Podobnie, tymi samymi pozycjami są [5] i [30]; [14] i [132]; [42] i [133]; [66] i [87]; [41] i [142]; [50] i [121], przy czym ta pierwsza nie ma podanego tomu. Pozycje [86] i [114] są tymi samymi, choć do jednej autor podaje rok wydania 2016, a dla drugiej 2017. Pozycje [81] i [140] choć dotyczą tej samej publikacji różnią się autorami.

Chciałbym zaznaczyć, że powyższe uwagi w żadnym stopniu nie zmieniają mojej pozytywnej oceny pracy Pana mgr. Jakuba Dzitko. Uważam, że cel pracy jakim było przeprowadzenie badań układów preformulacyjnych proleków z grupy antybiotyków  $\beta$ -laktamowych z wybranymi substancjami pomocniczymi został osiągnięty, a wyniki badań poszerzają dotychczasową wiedzę w tym zakresie. Recenzowana praca doktorska przedstawia oryginalne i wartościowe elementy naukowe, zawiera wiele wyników już opublikowanych w czasopiśmie naukowych o zasięgu krajowym jak i międzynarodowym. Oceniana praca, pomimo kilku pytań i drobnych krytycznych

uwag wnosi wiele ciekawych elementów zarówno poznawczych jak i praktycznych. Aktualna tematyka, wszechstronna wiedza o problemach wykorzystania proleków  $\beta$ -laktamowych, szereg zastosowanych metod eksperymentalnych do badań właściwości fizykochemicznych i mikrobiologicznych układów binarnych i wreszcie omówienie i interpretacja otrzymanych wyników świadczą o dobrym przygotowaniu mgr. Jakuba Dzitko do pracy badawczej.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że rezultaty zawarte w pracy prezentowane były na konferencjach krajowych i międzynarodowych (6 prezentacji) jak również w ośmiu publikacjach (3 prace w czasopismach z listy filadelfijskiej i 5 spoza listy) o cyrkulacji międzynarodowej. Taki dorobek publikacyjny świadczy o pracowitości i zaangażowaniu Autora w pracę badawczą.

*Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr Jakuba Dzitko zgodnie z rozporządzeniem z dnia 15 stycznia 2004 (Dz.U. z 2014 r., nr 15 poz 128 z późniejszymi zmianami) oraz art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) w pełni spełnia wymogi określone przez wyżej wymienione przepisy prawa. Stosownie do powyższego, wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr Jakuba Dzitko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.*

