



Kierownik - prof. dr hab. n. farm. Wiesław Sawicki

Gdańsk, 25. 01. 2022

Ocena pracy doktorskiej mgr. farm. inż. Jakuba Mikołajewskiego pt.: „Kinetyka przemiany treosulfanu i jego epoksytransformerów w warunkach *in vitro*”. Kolegium Nauk Farmaceutycznych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Promotor: prof. dr hab. Franciszek Główka. Promotor pomocniczy: dr hab. Michał Romański

W ostatnim czasie na forum Rady Doskonałości Naukowej oraz w kilku artykułach poruszono zagadnienie dotyczące kryzysu recenzji również prac doktorskich. Kryzys ten ma przejawiać schematycznością, szerokim opisywaniem i streszczaniem treści dysertacji, unikaniem krytyczności. Zaleca się, aby rzetelna opinia (recenzja) zawsze zawierała ocenę i uzasadnienie, aby pokazywała nowość w danej dyscyplinie nauki i określała wkład doktoranta w rozwój tej dyscypliny. Dlatego też pisząc tę recenzję starałem się do tych uwag dostosować.

Opiniowana praca doktorska jest autorstwa mgr. farm. inż. Jakuba Mikołajewskiego i została zrealizowana w trybie niestacjonarnym ramach Studium Metodologii Badań Naukowych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Treosulfan (Treo) jest lekiem o budowie stereochemicznej i należy do grupy cytostatyków alkilujących. W leczeniu stosowany jest wyłącznie enancjomer Treosulfanu o konfiguracji bezwzględnej wokół centrum chiralności określanej jako *sinister* – lewy – S. Określając precyzyjnie Treo to prolek, którego aktywność terapeutyczna jest determinowana nieenzymatyczną przemianą do dwóch epoksy pochodnych: monoepoksydu (EBDM) i diepoksydu (DEB). Szybkość tego procesu przemiany jest uzależniona od fizycznych

1/1

parametrów pH i temperatury. Już to dla farmaceuty fizykochemika o zainteresowaniach biofarmaceutycznych i preformulacyjnych stanowi bardzo ciekawy naukowy temat badań ukierunkowanych na stabilność – trwałość i kinetykę procesu przemiany TREO i jego epoksy pochodnych. Zwłaszcza, że dotychczasowe dane piśmiennictwa z tej tematyki są stosunkowo skromne a zbadana kinetyka reakcji aktywacji TREO do EBDM i DEB została scharakteryzowana jedynie w zakresie pH 5,0 - 10,0 i temperaturze 37 °C oraz pH 7,4 i 40 - 80 °C.

Dlatego też postawiony przez Pana mgr. farm. Jakuba Mikołajewskiego cel pracy doktorskiej zbadania kinetyki przemiany TREO w szerokim od 1,0 do 12,0 zakresie pH i temperatury 40-80 °C uważam za bardzo trafny i wartościowy. Dobrze, że cel przedstawionego do rozwiązania problemu naukowego jest napisany, krótko i konkretnie w punktach. Brakuje mi tam tylko słowa – ocena - uzyskanych wyników pomiarów np. („zbadanie i ocena kinetyki przemiany treosulfanu.....”).

Bardzo dobrze napisana jest część teoretyczna pracy doktorskiej. Doskonale wprowadza i wyjaśnia cel prowadzonych badań. Precyzyjnie według aktualnej wiedzy autor przedstawia właściwości fizykochemiczne TREO, mechanizm i aktywność działania farmakologicznego, opis form leku, farmakokinetykę, aspekty toksykologiczne oraz wysocesprawne metody analityczne z ważnymi informacjami dotyczącymi oznaczania API w materiale biologicznym. Część teoretyczna zawiera zatem wszystko to co w doktoracie w dyscyplinie nauk farmaceutycznych jest takiej tematyce kluczowe.

Odnosnie zastosowanej metody pomiarowej – analitycznej stężeń TREO i epoksytransformerów w analizowanych próbkach Doktorant mgr Jakub Mikołajewski znakomicie wykorzystał, opanował i dostosował technikę HPLC z detekcją refraktometryczną (RID) opracowaną w roku 2013 w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu przez Zespół pod kierunkiem Pana prof. Franciszka Głównki. Metoda została bardzo poprawnie zaprojektowana, zwalidowana i opisana. Świadczą o tym bardzo dobre publikacje w *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013; 72: 145-49 i *J. Pharm. Sci.* 2015; 104: 4433-42.

W pracy doktorskiej mgr. Jakuba Mikołajewskiego przeprowadzono i oceniono częściową walidację metody HPLC-RID z wykorzystaniem jako matrycy buforu fosforanowego

o pH 7,5 i stężeniu 0,06 mol/l. Potwierdzono i udowodniono jej selektywność, liniowość, precyzję i dokładność a ponadto wyznaczono LOQ dla TREO, EBDM i DEB.

Opisany sposób walidacji jest oczywiście poprawny. Jeżeli miałbym coś zasugerować to, to że Doktorant w trakcie walidacji nie odniósł się do wytycznych ICH i/lub FDA. Ponadto dodał bym jeszcze tzw. ocenę elastyczności/odporność metody analitycznej (ang. robustness), które wywodzi się z DoE i powoli staje się już rutynowym elementem walidacji metod analitycznych.

W pracy doktorskiej po raz pierwszy opisano rozkład TREO w środowisku o zakresie pH od 1,0 do 4,0. Wykazano, że TREO pod wpływem wody ulega głównie procesowi hydrolizy neutralnej. Wyznaczone na tej podstawie stałe szybkości hydrolizy neutralnej TREO oraz wielodobowe okresy półtrwania są dowodem na wysoką trwałość TREO w roztworach wodnych w niskim zakresie pH. Bardzo doceniam to, że Pan mgr farm. inż. Jakub Mikołajewski na tym stwierdzeniu nie poprzestaje i dalej w racjonalny sposób naukowy w oparciu o obecność w cząsteczce TREO grup hydroksylowych i związanych z tym oddziaływań elektronowych wyjaśnia przyczyny tej dobrej stabilności TREO w odniesieniu do leku busulfanu.

Doktorant wielokrotnie udawadnia, że umie pracować w zespole naukowym oraz wykorzystywać i rozwijać efekty prac swoich promotorów jak np. wyjaśnienie w oparciu o wewnątrzcząsteczkową reakcję Williamsona procesu rozkładu TREO w środowisku pH powyżej 4, opisaną wcześniej w *J. Pharm Sci* 2017; 106: 1917-22. W omówieniu wyników Doktorant przebieg tego procesu hydrolizy a także innych analizuje szczegółowo, dyskutuje z danymi piśmiennictwa a dokonane i przedstawione obliczenia kinetyczne oraz profile kinetyki rozkładu (np. ryc. 33) są przekonująco rzetelne i dowodzą, że Doktorant jest w tego typu pomiarach i wyliczeniach specjalistą.

Podobnie niemałego już doświadczenia i teoretycznej wiedzy wymagało naukowo przekonujące wyjaśnienie złożonego profilu reakcji rozkładu $\log k_{pH} = f(pH)$ dla monoepoksydu w roztworach wodnych w zakresie temperatury 40-80 °C w procesach neutralnej hydrolizy wiązania sulfonowego i pierścienia epoksydowego, hydrolizy kwasowej i zasadowej pierścienia epoksydowego oraz epoksydacji prowadzącej do utworzenia diepoksydu.

U/M

Doktorant na str. 146 pracy przedstawił sześć syntetycznych wniosków. W mojej opinii są one precyzyjne. Uważam jednak, iż powinny w większym stopniu korelować z tak konkretnymi założeniami postawionymi w celu pracy. Nie koncentrowałby się aż tak bardzo mechanizmach reakcji rozkładu a odniósł się w większym stopniu do przewidywanego znaczenia biofarmaceutycznego kinetyki rozkładu TREO, EBDM i DEB oraz wyznaczonych parametrów termodynamicznych np. parametru stabilności $t_{0,1}$. Ale to tylko moje przemyślenia- komentarz, ale absolutnie nie zarzut.

Wyniki pracy i eksperymentów naukowych zawsze muszą służyć jakiemuś celowi. I cel ten w doktoracie mgr Jakuba Mikołajewskiego jest konkretny i dobrze sprecyzowany. Dla mnie technologa postaci leku na etapie badań preformulacyjnych wyniki tego doktoratu mają znaczenie szczególne. Mogą być bowiem wykorzystane aplikacyjnie np. w opracowywaniu metod otrzymywania doskonalszych, stabilniejszych termodynamicznie postaci leku z treosulfanem. I dlatego takie prace- pomiary i obliczenia fizykochemiczne, kinetyczne uważam za bardzo potrzebne i wartościowe.

Generalnie praca jest zredagowana starannie i rzetelnie z bardzo poprawnym i konsekwentnym zapisem piśmiennictwa. Mogłaby być zapewne napisana bardziej syntetycznie na mniej niż 173 stronach, ale i tak czyta się ją bardzo dobrze.

Natrafiałem jednak na drobne uchybienia z których niektóre przytaczam poniżej:

str. 23, 4. wiersz od dołu jest: startła szybkości – powinno być – **stała** szybkości ;

str. 30, 9. wiersz od dołu jest: TREO charakteryzowało – powinno być – **charakteryzował**;

str. 37 i 38 . Tabela 5 i 6 . Przy podpisie tabeli na dole przy oznaczeniu symboli jest – AUC pod krzywą – powinno być – **pod krzywą**;

str. 39, 22. wiersz od dołu jest: hydrofilowego **charakteru** – powinno być hydrofilowych **właściwości**;

str. 49. W tabeli 9 brakuje **numerów serii** użytych do badań substancji leczniczych – treosulfanu i paracetamolu (acetaminophenonu);

str. 56 i 134, ale też i inne w doktoracie np. p. 8.2 i 8.4 – brak konsekwencji (raz dużą raz małą literą) w zapisie wartości stężeń np. raz jest 0,15 mol/l a raz 1 mol/L .

Mam jedną uwagę, którą chciałbym zaakcentować. Wynika to moich bardzo dobrych relacji z wybitnymi polskimi uczonymi – analitykami z Gdańska przykładowo Ś.p. profesorem Jackiem Namieśnikiem- Politechnika Gdańska, który zawsze uczył i apelował iż absolutnie nie powinno się używać sformułowania **rozdział chromatograficzny** a prawidłowo **rozdzielenie chromatograficzne**. W swojej pracy Pan mgr inż. Jakub Mikołajewski określenia rozdział używa np. na str. 57, 61, i 134 w p. odpowiednio 9.1.1 czy 11. 1.

Praca doktorska mgr farm. inż. Jakuba Mikołajewskiego stanowi oryginalne, znaczące rozwiązanie postawionego celu naukowego. Doktorat zawiera również wyniki naukowego postępu, gdzie np. $\log k_{pH}=f(pH)$ analizowanych substancji czynnych zostały wyznaczone po raz pierwszy w tak szerokim- pełnym zakresie pH. Doktorant wyniki swoich badań, które są kontynuacją naukowych zainteresowań pracy magisterskiej opublikował jako drugi autor w uznanym naukowo czasopiśmie z bazy Web of Science – amerykańskiej firmy Clarivate Analytics - J. Pharm. Sci. 2017; 106:5156-3160.

Praca doktorska i publikacje naukowe powstały dzięki dobrej wiedzy Doktoranta z dyscypliny nauk farmaceutycznych w ścieżce tematycznej chemii obliczeniowej i szeroko rozumianej farmacji fizycznej. Kandydat udowodnił, że potrafi pracować w naukowym zespole i wykorzystywać tego zespołu doświadczenie. W moim przekonaniu, bez wątpienia posiada też już umiejętności samodzielnego prowadzenia eksperymentów naukowych.

Konkluzja: Całościowo pracę doktorską oceniam wysoko. Ma ona dużą wartość poznawczą i stanowi oryginalne rozwiązanie postawionych przez Doktoranta problemów naukowych. Stąd też przedkładam Szanownej Kapitulie Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu wniosek o dopuszczenie Pana mgr. farm. inż. Jakuba Mikołajewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Składam również propozycję wyróżnienia tego doktoratu. Syntetyczne uzasadnienie wniosku o wyróżnienie dołączam do recenzji.

K I E R O W N I K
Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
prof. dr hab. n. farm. Wiesław Sawicki
tel. 58 349 12 79, faks 58 349 16 52
wsawicki@gumed.edu.pl

prof. Wiesław Sawicki



Gdańsk, 25. 01. 2022

Wniosek o wyróżnienie

pracy doktorskiej mgr. farm. inż. Jakuba Mikołajewskiego pt.: „*Kinetyka przemiany treosulfanu i jego epoksytransformerów w warunkach in vitro*”. Kolegium Nauk Farmaceutycznych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Promotor: prof. dr hab. Franciszek Główka. Promotor pomocniczy: dr hab. Michał Romański

Za:

- rzetelne rozwiązanie celu naukowego z dyscypliny nauk farmaceutycznych w ścieżce tematycznej chemii obliczeniowej i szeroko rozumianej farmacji fizycznej;
- profesjonalne, eksperckie wykonanie pomiarów i obliczeń kinetycznych w oparciu interdyscyplinarną wiedzę z zakresu fizykochemii leku wspartą doświadczeniem politechnicznym;
- bardzo poprawną redakcją doktoratu, którego treści mogą zostać wykorzystane w badaniach preformulacyjnych technologii farmaceutycznej .
- opublikowanie części doktoratu w naukowej bazie Web of Science – amerykańskiej firmy Clarivate Analitics - J. Pharm. Sci. 2017; 106:5156-3160.

prof. Wiesław Sawicki

K I E R O W N I K
Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
prof. dr hab. n. farm. Wiesław Sawicki
tel. 58 349 12 79, faks 58 349 16 52
wsawicki@gumed.edu.pl

