

dr hab. n. farm. Małgorzata Maciążek-Jurczyk, prof. SUM

Katowice, 12.01.2022

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**pt. „KINETYKA PRZEMIANY TREOSULFANU I JEGO EPOKSYTRANSFORMERÓW W WARUNKACH *in vitro*”**

**wykonanej przez**

**mgr farm. Jakuba Mikołajewskiego**

**w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki**

**Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

**Przewód doktorski realizowany w ramach**

**Podyplomowego Niestacjonarnego Studium Badań Naukowych**

**Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

**Promotor: prof. dr hab. Franciszek Główka**

**Promotor pomocniczy: dr hab. Michał Romański**

Ocenę przygotowano w związku z pismem NR KKN-1817/2021 z dnia 26.11.2021 Kanclerz Kolegium Nauk Farmaceutycznych, prof. dr hab. Judyty Cieleckiej – Piontek, zgodnie z uchwałą nr 28/2021 Kapituły Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, z dnia 25.11.2021.

Podstawą ubiegania się Pana mgr Jakuba Mikołajewskiego o stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych jest monografia zatytułowana „Kinetyka przemiany treosulfanu i jego epoksy pochodnych w warunkach *in vitro*”, która powstała pod kierunkiem Pana prof. dr hab. n. farm. Franciszka Główki. Promotorem pomocniczym był Pan dr hab. n. farm. Michał Romański. Przedstawiona do oceny praca podejmuje ważne zagadnienie z punktu widzenia farmakoterapeutycznego i poznawczego dotyczące oceny kinetyki przemiany treosulfanu i jego epoksytransfor-

merów. Pan mgr Jakub Mikołajewski jest absolwentem Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W 2014 roku obronił pracę magisterską, którą realizował pod opieką Pana prof. dr hab. Franciszka Głównki i Pana dr hab. Michała Romanowskiego pn. „Wyznaczanie parametrów termodynamicznych reakcji aktywacji treosulfanu w warunkach *in vitro*”. Biorąc pod uwagę powyższe można sądzić, iż Pan mgr przystępując do realizacji pracy doktorskiej był solidnie do podjęcia doktoratu przygotowany, a prowadzone badania w mojej opinii mogą stanowić uzupełnienie dotychczas opublikowanych pozycji, co jest wysoce cenione na tym etapie pracy naukowej.

Treosulfan (TREO) to przykład cytostatyku alkilującego o umiarkowanej toksyczności i wykazanej aktywności klinicznej w leczeniu zaawansowanego raka jajnika, przerzutowego czerniaka skóry i błony naczyniowej oka. Jest prolekiem, którego aktywność uwarunkowana jest jego przemianą na drodze nieenzymatycznej reakcji aktywacji, zależnej od pH i temperatury, do dwóch epoksy pochodnych, mono- (EBDM) i diepoksydu (DEB) wykazujących działanie alkilujące. TREO jest analogiem strukturalnym busulfanu (BU), leku stosowanego w chemioterapii nowotworów, jednak jego mechanizm alkilowania DNA jest odmienny. Został zarejestrowany w leczeniu drugiej linii raka jajnika opornego na pochodne platyny. W ostatnich latach jest stosowany jako lek mieloablacyjny w kondycjonowaniu przed allo-HSCT, czyli allogenicznym przeszczepianiem krwiotwórczych komórek macierzystych, ze względu na niską toksyczność narządową w porównaniu do busulfanu. Dane pochodzące z bazy SCOPUS dostarczają wielu informacji na temat zastosowania TREO w lecznictwie, brakuje jednak prac dotyczących pełnego zestawienia wpływu pH i temperatury w szerokim zakresie na rozkład zarówno TREO, jak i jego epoksy pochodnych. Biorąc pod uwagę właściwości fizykochemiczne, TREO mógłby być powszechnie stosowany w lecznictwie, dlatego poznanie parametrów kinetycznych i termodynamicznych rozkładu TREO i jego epoksy pochodnych w szerokim zakresie pH i temperatury wydają się niezbędne.

Rozprawa doktorska mgr Jakuba Mikołajewskiego jest uwieńczeniem jego badań nad kinetyką treosulfanu i jego epoksytransformerów oraz wpływem pH i temperatury na wartości stałych szybkości badanych reakcji. Podjęcie przez Doktoranta niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione z punktu widzenia poznawczego i farmakoterapeutycznego. Badania wpisują się w prace nad poszukiwaniem nowych danych uzupełniających istniejącą wiedzę, gdyż poruszają problematykę, która uprzednio nie była dyskutowana (np. szeroki zakres pH). Cel doktoratu jest tematyką naukową z jednej strony popularną, lecz biorąc pod uwagę potrzebę kompleksowej znajomości kinetyki przemian proleków coraz częściej stosowanych w farmakoterapii, może stanowić element badań rozwojowych.

Jak wcześniej wspomniano, praca stanowi formę typowej monografii, liczy 173 strony i stanowi spójną całość. 31 stron to poprzedzona **wykazem stosowanych skrótów**, dobrze zredagowana **część teoretyczna**, w dobrej proporcji do części doświadczalnej, która dotyczy ogólnej charak-



terystyki treosulfanu, jego budowy, właściwości fizykochemicznych, kinetyki aktywacji, mechanizmu działania, aktywności farmakologicznej, toksyczności, farmakokinetyki czy metod analitycznych służących do jego oznaczania.

Po części teoretycznej sformułowano **cel pracy**, który obejmował 7 jasnych i spójnych zadań tożsamyh z kolejnymi etapami badań. Doktorant przyjął za cel swoich badań walidację metody HPLC w odwróconym układzie faz z detekcją refraktometryczną, która pozwala na oznaczenie stężeń TREO i jego epoksytransformerów, badania kinetyki rozkładu TREO w roztworach wodnych o zadanym zakresie pH i temperatury oraz obliczenia stałych szybkości reakcji, parametrów termodynamicznych czy wykreślenie profili zależności logarytmu ze stałej szybkości reakcji w funkcji pH wraz z kompleksową analizą i interpretacją.

**Część doświadczalna** stanowi 25 stron, gdzie mgr Mikołajewski opisał zastosowaną aparaturę i sprzęt laboratoryjny, materiały i odczynniki, roztwory stosowane w pracy, walidację metody oraz metodykę badań i obliczeń kinetycznych. Przystępując do wspomnianej części doświadczalnej Doktorant wykorzystał doświadczenie innych badaczy, a przede wszystkim Pana prof. Głównki, promotora pracy i jego zespołu, których bardzo mocną stroną są prowadzone z sukcesem badania kinetyczne, a opracowana metodyka m.in. HPLC z detekcją RID, charakteryzująca się wysoką precyzją i dokładnością oznaczeń jest wykorzystywana od lat. By dobrze przeprowadzić doświadczenie, Doktorant musiał pozyskać anality do przeprowadzenia walidacji metody analitycznej i reakcji rozkładu podczas badań kinetycznych, a sama walidacja metody potwierdziła jej selektywność, liniowość, precyzję oraz dokładność.

Doktorant wykazał się pracowitością i umiejętnością wykonania niezbędnych obliczeń, które stanowiły obszerną część pracy zebraną w formie 57 stron **wyników**, przedstawionych w formie 26 Rycin i 42 Tabel (pozostałe 17 Tabel i 15 Rycin znajdują się w części teoretycznej i doświadczalnej rozprawy).

**Omówienie wyników** przez Doktoranta i wyczerpująca **dyskusja** na 11 stronach monografii pozwoliły spojrzeć kompleksowo na zadany cel badawczy, tj. nie dzieląc osobno wpływu pH i temperatury na wyznaczone parametry. Mgr Mikołajewski poprawnie zinterpretował wyniki badań przedstawionych na Rycinach i w Tabelach (brakuje w rozdziale odniesienia do Tabel 21 – 38, 40 – 48, 50 – 58 oraz Rycin 13 – 30, 34 – 38) i skonfrontował je z obserwacjami innych autorów, co świadczy o Jego wiedzy także z zakresu nauk chemicznych oraz znajomości piśmiennictwa, zarówno archiwalnego, jak i tego z ostatnich lat. Doktorant sformułował 6 **wniosków**, które odzwierciedlają najistotniejsze elementy poznawcze pracy i wykazał, iż reakcje rozkładu TREO i jego epoksytransformerów w środowisku wodnym są procesami pierwszego rzędu względem stężenia tych związków, a za rozkład TREO odpowiada zależna od pH wewnątrzcząsteczkowa reakcja Williamsona prowadząca do powstania EBDM oraz hydroliza neutralna wiązania sulfonowego. Udowodnił, iż rozkładowi EBDM towarzyszą następujące reakcje: zależna od pH we-

wnątrzcząsteczkowa reakcja Willsona, której produktem jest DEB, hydroliza pierścienia epoksydowego katalizowana jonami wodorowymi oraz hydroliza neutralna pierścienia epoksydowego i wiązania sulfonowego. W rozkładzie związku występuje też ogólna kataliza kwasowo-zasadowa. Natomiast w rozkładzie DEB ogólna i właściwa kataliza kwasowo – zasadowa, która obejmuje hydrolizę pierścienia epoksydowego katalizowaną jonami wodorowymi i wodorotlenowymi oraz hydrolizę spontaniczną pierścienia epoksydowego pod wpływem wody. Mgr Mikołajewski udowodnił największą trwałość badanych związków w środowisku o pH 1.0 – 4.0 dla TREO, 4.0 – 5.0 dla EBDM i 4.0 – 9.0 dla DEB, przy których ich rozkładowi towarzyszy hydroliza neutralna. Oceniał także, iż równanie Arrheniusa opisuje zależność stałych szybkości reakcji od temperatury, a wyznaczone parametry termodynamiczne charakteryzują mechanizm reakcji. Biorąc pod uwagę powyższe uważam, iż cel pracy został spełniony, a wyniki i dyskusja nad nimi wykazują znamiona oryginalności.

Treść dysertacji kończy przejrzyste zredagowane **streszczenie**, przedstawione w języku polskim i anglojęzycznej wersji oraz **spis tabel i rycin**.

Wysoko oceniam umiejętności warsztatowe Doktoranta, umiejętność rozwiązywania problemów badawczych, wyniki, ich innowacyjność (zastosowanie po raz pierwszy tak szerokiego zakresu pH) i możliwość aplikacyjnego zastosowania w celach terapeutycznych bądź analitycznych. Warto zwrócić uwagę na fakt, iż zagadnienia omawiane przez Doktoranta stanowią przedmiot intensywnych badań, o czym świadczy bogata literatura zamieszczona w **piśmiennictwie** rozprawy doktorskiej (153 pozycje literaturowe, w ogromnej większości anglojęzyczne, 25 pozycji pochodzi z ostatnich 5 lat, gdzie w jednej pozycji Doktorant jest współautorem).

Praca zredagowana została bardzo starannie i estetycznie, ale z obowiązku recenzenta muszę przytoczyć kilka uchybień natury stylistycznej – interpretacyjnych, które nie mają znaczenia w merytorycznej ocenie rozprawy doktorskiej i niektóre spośród tychże nie wymagają ustosunkowania się. Na wstępie chciałam zwrócić uwagę na brak dołączonego dorobku naukowego i życiorysu, które powinny zasilić karty monografii (zostały dostane w osobnych korespondencjach).

#### Rozdział: WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- ponieważ Pan Doktorant objaśnia skróty pochodzące z języka angielskiego poprzez ich rozwinięcie, które poprzedzone jest tłumaczeniem na język polski, poniżej kilka skrótów, które tego wymagają:

• AUC – area under the curve (str. 9)

IS – internal standard – wydaje się, iż podanie w tym miejscu paracetamolu, jako przykład standardu nie jest zasadne, można niefortunnie uznać, iż lek ten jest jedynym stosowanym wewnętrznym wzorcem (str. 10)



LOQ – limit of quantification – znacznie lepiej, jeśli LOQ będzie opisane jako granica oznaczalności, a nie oznaczalność (str. 11)

SD – standard deviation (str. 12)

-  $\Delta G$  i  $\Delta H$  – to zmiany molowej entalpii swobodnej stanu przejściowego i molowej entalpii stanu przejściowego, definiowane jako free enthalpy or enthalpy change (str. 9)

-  $k_{SN}^2$  (EBDM),  $k_{SN}^2$  (TREO) – błąd stylistyczny – winno być „stała” a nie „stałej” (str. 11)

#### Rozdział: WSTĘP

- Doktorant pisze na str. 13, iż „Pierwszego opisu właściwości kinetycznych .... dokonali ... w roku 1970” a na str. 23 pisze, że „Pierwsze próby zbadania kinetyki aktywacji TREO dokonał Matagne w roku 1967 – należy to ustalić i wyjaśnić

- „od pH 7,4” – powinno być „o pH 7,4” (str. 13)

- „TREO było” – powinno być „TREO jest” (str. 13)

#### Rozdział: CZĘŚĆ TEORETYCZNA

- „w projekcji Fishera” – powinno być „w projekcji Fischera” (str. 16)

- masa cząsteczkowa związku nie wynosi 278.3 g/mol, gdyż jest to masa molowa (tak jak z resztą słusznie Doktorant napisał w Tabeli 1 – masa cząsteczkowa to 278.3 u. Podobnie jest na str. 40

- zdanie „rozpuszczalność w innych polarnych rozpuszczalnikach organicznych jest bardzo zróżnicowana. Lek bardzo dobrze rozpuszcza się w acetonie, z kolei w chloroformie jest praktycznie nierozpuszczalny” należy przereklamować, gdyż z niego wynika, iż chloroform jest rozpuszczalnikiem polarnym (str. 17)

- „grypy hydroksylowe” – powinno być „grupy hydroksylowe” (str. 20)

- „starta szybkości” – powinno być „stała szybkości” (str. 23)

- „EDBM” – powinno być „EBDM” (str. 24)

- tytuł podrozdziału 1.5 brzmi „Mechanizm działania” – aby tytuł był bardziej czytelny, wydaje się, iż powinien brzmieć: „Mechanizm działania TREO” (str. 26)

- „glukozaminoglikany” – powinno być „glikozaminoglikany” (str. 26)

- „ostra białaczkę” – powinno być „ostrą białaczkę” (str. 30)

- „właściwości mielobalacyjne” – powinno być „właściwości mieloablacyjne” (str. 31) oraz „mielobalcję” – powinno być „mieloablację” (str. 32)

- „dawki leki” – powinno być „dawki leku” (str. 31)

- „monopeksydu” – powinno być „monoepoksydu” (str. 39)
- $V_{SS}$  – to objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym – brakuje w tekście rozwinięcia skrótu (str. 41)
- „W eliminację DEB zaangażowane jego” – powinno być „W eliminację DEB zaangażowane są jego” (str. 42)
- EH – to hydrolaza epoksydowa – brakuje w tekście rozwinięcia skrótu (str. 42)
- Doktorant pisze „miejszem ataku jest węgiel C-2” – powinno być napisane „miejszem ataku jest atom węgla C-2”
- „epoksytransformerów roztworach wodnych” – powinno być „epoksytransformerów w roztworach wodnych” (str. 45)
- wyraz „Kolumna HPLC” powinien być napisany małą literą (str. 48)

#### Rozdział: CEL PRACY

- pierwsze zdanie w rozdziale jest napisane nazbyt zwięźle, co sprawia, że jest zrozumiałe tylko dla osób bezpośrednio związanych z doświadczeniem – proponuje się: „Celem pracy było zbadanie kinetyki przemiany treosulfanu (Treo) do mono (EBDM) i diepoksydu (DEB) oraz kinetyki przemiany EBDM i DEB w różnych warunkach temperatury i pH”
- pkt. 1 – „z detekcją refraktometryczną pozwalająca” – powinno być „z detekcją refraktometryczną pozwalającą” (str. 47)

#### Rozdział: CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

- sugeruję, aby przed wysłaniem pracy do Redakcji czasopisma dodać nr LOT do zastosowanych odczynników (str. 49)
- wzór (2) – brakuje pełnej nazwy odczynnika (str. 49)
- Tabela 10 – zaleca się, aby stosować nieparzystą ilość roztworów wzorcowych (str. 51)
- siła jonowa roztworu jest wielkością bezwymiarową – ponadto Doktorant przypisuje jej wymiar mol/Litr (jednostka użytego stężenia), a w Tab. 21-38 i Ryc. 13-30 -  $\mu\text{mol/Litr}$  (str. 52 i inne)
- symbolika jednostek wymaga ujednolicenia, mol/l zamiast mol/L wymaga korekty (str. 56)
- „dokładność dostała” – powinno być „dokładność została” (str. 63)
- wzór (4): opis symboli użytych we wzorze – t oznacza czas trwania reakcji, niezrozumiałym jest zastosowanie opisu symbolu t jako „obserwowana” (str. 66)
- wzór (16): błąd  $k_1$  – brakuje symbolu „ $\Delta$ ” (str. 69)



- podając wzory winno się podać także źródło pochodzenia oraz jednostki
- brakuje informacji nt. precyzji pomiaru temperatury w termostатовanej łaźni wodnej
- z części teoretycznej wynika, iż wykonano standardowe pomiary statystyczne, brakuje jednak informacji m.in. nt. liczebności przeprowadzonych prób, czy zastosowanych testów – sugeruje się omówienie tych kwestii w osobnym rozdziale, którego brakuje, pn. „OBLICZENIA STATYSTYCZNE”.

#### Rozdział: WYNIKI

- Rozdziały 15 – 18 składają się łącznie z 39 Tabel i 26 Rycin i żadna z tych Tabel i żadna z Rycin nie została opatrzona ani jednym słowem interpretacji czy komentarza – należało przynajmniej napisać, jaką zależność czytelnik w danej Tabeli czy na Rycinie ma zauważyć, odczytać, itp.
- mając na uwadze równanie kierunkowe linii prostej  $y = ax + b$ ,  $b$  oznacza wyraz wolny równania linii prostej, nie jest współczynnikiem regresji, jak opisano na str. 74 – podrozdział 14.2 – Linio-wość
- z Tabeli 20 wynika, iż wartości względnego błędu oznaczeń mieszczą się w zakresie od 0,1 do 5,3% - w tekście jest informacja, iż mieszczą się w zakresie od 0,4 do 4,5% (str. 77)
- Tabela 26, 27 i inne – w tytule powinno się podać symbol stężenia  $[B]_{\text{T}}$  (str. 87, 91 i inne)
- Ryc. 28 – w tytule błędny zakres temperatury 40 – 60°C – powinien być 40 – 80°C (str. 108)
- założenia, z których wynika różna liczba punktów na wykresie wymagają wyjaśnień; zrozumiałym jest fakt, że związane jest to z czasem przebiegu reakcji, niemniej jednak wymaga to krótkiego opisu
- na wykresach zamieszczono zmiany stężeń związków obserwowane podczas aktywacji i rozkładu w różnych pH, sile jonowej oraz temperaturze w funkcji czasu – w dyskusji brakuje opisu, dlaczego mamy do czynienia z taką rozbieżnością czasową,  $t$  w minutach, sekundach i godzinach?

#### Rozdział: OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

- w mojej ocenie tytuł powinien brzmieć „Omówienie wyników i dyskusja” (str. 133)
- „hydroliza pierścienia epoksydowego katalizowanej jonami” – powinno być „hydroliza pierścienia epoksydowego katalizowana jonami” (str. 142)
- należy ujednoczyć, czy reakcja jest katalizowana jonami  $H^+$ , czy  $H_3O^+$  (str. 142)
- „wyższa  $E_a$  oznacza, że suma energia substratów musi być wyższa” oraz „wpływ temperatury ... jest również wyższy” – obie frazy wymagają przereformulowania (str. 142)

Rozdział: PIŚMIENNICTWO

- brak zwartości w formatowaniu niektórych pozycji:

pozycja 43 – nazwa czasopisma winna być podana jako uznany międzynarodowo akronim (skrótowiec) (str. 162)

W trakcie obrony proszę o dyskusję nt. następujących problemów:

- proszę o wyjaśnienie, czym kierowano się wybierając paracetamol jako standard
- nie mam zastrzeżeń do koncepcji pracy i sposobu jej realizacji, ale proszę o wyjaśnienie, dlaczego zakres pH inny niż 5.0 – 10.00 z punktu widzenia farmaceuty jest tak istotny, zwłaszcza że w np. części teoretycznej Doktorant zamieścił informację, iż cyt. „przy pH niższym niż 5.0 szybkość reakcji aktywacji jest tak niewielka, że przyjmuje się, iż praktycznie nie zachodzi”. Wyjaśnienia wymaga górny zakres pH roztworów wodnych, tj. 10.0 dla badania kinetyki rozkładu TREO, 12.0 DEB i 9.0 EBDM. Podobnie proszę o wyjaśnienie zastosowania tak szerokiego zakresu temperatur 40 – 80°C, zwłaszcza tych wysokich temperatur i odniesienie przeprowadzonych badań do praktyki
- biorąc pod uwagę jeden z nadrzędnych celów pracy, jakim jest badanie wpływu temperatury na stałe szybkości reakcji, proszę o sformułowanie konstruktywnego wniosku świadczącego o innowacyjności zadania
- czy Pana zdaniem istnieją inne techniki badawcze, które mogłyby pozwolić na potwierdzenie wysnutych z Pana badań wniosków?
- w mojej ocenie brakuje we wnioskach jednego głównego dotyczącego nowatorskiego aspektu pracy i zastosowania w praktyce, co mogłoby stanowić wymierny efekt przeprowadzonych badań

Ponadto proszę o wypowiedzenie się na następujące tematy:

- Jakie mogłyby zaistnieć korzyści wynikające z analizy wiązania TREO z białkami osocza i tkanek? Czy stężenie frakcji wolnej w osoczu i homogenatach tkanek wg literatury przekraczające 94% jest bezpieczne?

„ Czy istnieją jakieś alternatywne sposoby podawania leków, które zmniejszają ich toksyczność?



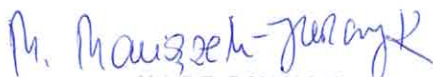
## WNIOSEK KOŃCOWY

Reasumując, pracę doktorską oceniam bardzo dobrze, stanowi ona oryginalne rozwiązanie i prawidłową ocenę postawionego problemu naukowego, a uzyskane wyniki mogą zostać rozpowszechnione w uznanych globalnie czasopismach. Jest pracą wartościową, starannie przygotowaną warsztatowo. Wnosi nowe elementy poznawcze w dziedzinie badań nad kinetyką przemian treosulfanu i jego epoksypochodnych, a wyniki zachęcają do zastosowania opracowanych metod w analizie innych proleków i ich pochodnych. Uzyskane rezultaty badań powinny bez trudu zostać opublikowane w dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Niestety w rozprawie nie znalazłam żadnych informacji o nawet częściowym opublikowaniu rezultatów, bądź innych formach upowszechniania uzyskanych wyników. Przedstawiony zakres prac badawczych mieści się w zakresie badań podstawowych, tym samym nie ma ograniczeń w ich publikowaniu. Nie znalazłam także informacji na temat źródła finansowania badań i ewentualnym udziale Doktoranta w projektach badawczych. Niemniej jednak rozprawa spełnia warunek rozwiązania oryginalnego problemu naukowego.

**Praca spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane dysertacjom doktorskim określone w obowiązujących przepisach ustawowych – Prawa o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Kapituły Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Pana Magistra Jakuba Mikołajewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Łączę wyrazy szacunku,

dr hab. n. farm. Małgorzata Maciążek-Jurczyk, prof. SUM



KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Farmacji Fizycznej  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

dr hab. n. farm.  
Małgorzata Maciążek-Jurczyk prof. SUM