



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

Adres: ul. Święcickiego 6.  
60-781 Poznań  
mkaraz@ump.edu.pl

tel 0-618546432

fax 0-618546430

Poznań 2019-05-20

## RECENZJA

pracy doktorskiej wykonanej przez mgr Karolinę Matyjaszczyk

pt: „Ocena właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych nowych związków,  
pochodnych antybiotyków antracyklinowych”

Poszukiwanie nowych leków syntetycznych wymaga długoletnich i kosztownych badań prowadzonych zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Przedmiotem doświadczeń *in vitro* jest określenie właściwości fizykochemicznych szeregu związków chemicznych oraz wstępne oszacowanie ich aktywności biologicznej, służące wyselekcjonowaniu jednego lub kilku najbardziej obiecujących kandydatów, kierowanych dalej do doświadczeń na modelu zwierzęcym. Coraz większą rolę w nowoczesnym projektowaniu leków metodami modelowania molekularnego odgrywa wykorzystanie chemii obliczeniowej, czyli tzw. badania *in silico*, służące do przewidywania właściwości fizykochemicznych, farmakokinetycznych i toksykologicznych związków na podstawie ich struktury. Praca doktorska mgr Karoliny Matyjaszczyk wykonana pod kierunkiem dr hab. Marii Walczak, prof. UJ, wpisuje się doskonale w nowoczesny nurt badań nad nowymi cząsteczkami o potencjalnym zastosowaniu w terapii. Jej celem była ocena właściwości fizykochemicznych oraz farmakokinetycznych nowych antybiotyków antracyklinowych pochodnych doksorubicyny i daunorubicyny i wyselekcjonowanie z nich kandydata do dalszych badań przedklinicznych.

Praca realizowana była w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków we współpracy z Instytutem Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie, który udostępnił związki do badań. Realizacja pracy wymagała od Doktorantki opracowania metod wyznaczania

właściwości fizykochemicznych z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej oraz czułych i selektywnych metod UPLC-MS/MS, pozwalających na oznaczanie stężenia badanych związków w osoczu myszy, a następnie określenia profilu farmakokinetycznego nowych antybiotyków antracyklinowych o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym.

W części teoretycznej swojej pracy Doktorantka przedstawia zagadnienia związane z właściwościami kwasowo-zasadowymi i lipofilowymi cząsteczek, z uwzględnieniem metod stosowanych do wyznaczania wykładnika stałej dysocjacji, współczynnika podziału i współczynnika dystrybucji. Omawia także modele predykcyjne w metodzie *in silico* modelowania tych parametrów fizykochemicznych. W dalszej części szczegółowo opisuje antybiotyki antracyklinowe pod kątem ich właściwości, mechanizmu działania i toksyczności. Zwraca uwagę na nowe antybiotyki antracyklinowe stosowane w leczeniu oraz na pochodne formamidynowe o potencjalnym zastosowaniu w terapii chorób nowotworowych, ze względu na większą aktywność antyproliferacyjną i lepszy profil bezpieczeństwa w porównaniu do antracyklin I generacji. Cel pracy został jasno sprecyzowany, chociaż brakuje uzasadnienia wyboru myszy jako modelu zwierzęcego w prezentowanej rozprawie. Zaplanowane zadania badawcze pozwalają na osiągnięcie założonego celu i zostały zrealizowane w całości. Część metodyczna jest właściwie zredagowana i dostarcza niezbędnych informacji odnośnie większości stosowanych technik i metod obliczeniowych. W części dotyczącej metody elektroforezy kapilarnej nie podano nazwy producenta stosowanych kapilar krzemionkowych. Brak też informacji, w jaki sposób obliczono objętość nastrzyku próbki. W części dotyczącej obliczeń farmakokinetycznych błędnie wpisano wzory na  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  oraz  $V_{ss}$ . Szczegółowo omówiono parametry wyznaczone w ramach walidacji metody, przeprowadzonej zgodnie z wytycznymi FDA i EMA. Jednak badania stabilności przeprowadzono jedynie podczas przechowywania badanych związków w podajniku próbek.

Przeprowadzone badania doprowadziły do ciekawych obserwacji. Wyznaczone wartości  $pK_a$  dla leków macierzystych oraz ich pochodnych formamidynowych wskazują, że modyfikacje w pierścieniu daunozaminy mają duży wpływ na właściwości kwasowo-zasadowe. Nowe pochodne w fizjologicznym pH występowały w postaci zjonizowanej i charakteryzowały się większą lipofilowością niż związki macierzyste. Natomiast na podstawie analizy farmakokinetycznej w modelu zwierzęcym stwierdzono, że badane związki charakteryzują się długimi czasami przebywania w organizmie, dużymi objętościami dystrybucji, co wskazuje na ich rozmieszczenie zarówno w przestrzeni zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowej, niewielkimi wartościami AUC, co

prawdopodobnie może wpływać na zmniejszenie kardiotoxyczności, oraz wyższą od związków macierzystych biodostępnością. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wytypowała związek EDOX-FMOR jako najbardziej obiecującego kandydata na lek.

Omówienie i dyskusja wyników, które są rzeczowe i niezwykle wnikliwe, potwierdzają dobrą znajomość poruszanej tematyki oraz dużą wiedzę Doktorantki na temat nie tylko stosowanych przez nią nowoczesnych metod analitycznych, ale także umiejętność wyciągania trafnych wniosków na podstawie uzyskanych wartości parametrów fizykochemicznych w celu określenia potencjalnego działania biologicznego nowych pochodnych antybiotyków antracyklinowych. Na uwagę zasługuje także umiejętność zastosowania modelu zwierzęcego do analizy farmakokinetycznej badanych związków. Konsekwencją tego rozdziału są wnioski, które trafnie podsumowują całą pracę. Uzyskane wyniki charakteryzuje duży potencjał aplikacyjny. Dostarczają one wskazówek odnośnie potencjalnego wykorzystania nowych związków w celu zwiększenia skuteczności terapii przeciwnowotworowej oraz ograniczenia kardiotoxyczności antybiotyków antracyklinowych.

Rozprawa mgr Karoliny Matyjaszczyk liczy łącznie 124 strony i ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Składa się z części teoretycznej w postaci wstępu, celu pracy, metodyki badań, wyników, ich dyskusji oraz wniosków, a także umiejętnie cytowanych 164 pozycji piśmiennictwa. Praca napisana jest poprawnie pod względem stylistycznym i gramatycznym. Wyniki przedstawiono w postaci licznych tabel i rycin. Zostały one poprawnie zinterpretowane i skomentowane w odniesieniu do danych literaturowych. Zastosowane metody badawcze są nowoczesne i zostały trafnie dobrane do rodzaju zadań badawczych i wyznaczonego celu.

Po zapoznaniu się z przedstawioną do recenzji pracą, nasuwają się następujące uwagi i propozycje:

- 1) Przeprowadzone badania stabilności badanych związków w matrycy biologicznej należałoby uzupełnić o test mrożenia i rozmrażania oraz badania trwałości podczas przechowywania osocza w temperaturze przygotowywania próbek i w temperaturze mrożenia próbek, zgodnie z wytycznymi EMA i FDA, na które powołuje się Doktorantka. Nie podano również trwałości badanych związków w roztworach.
- 2) Ryc. 4.4. Nie sprecyzowano, czy wykresy dotyczą zależności średnich czy przykładowych ruchliwości elektroforetycznych badanych związków od pH środowiska. W przypadku, gdy byłyby to średnie wyniki, można by zaznaczyć na

wykresie SD lub przynajmniej wpisać, z ilu wyników liczone były średnie ruchliwości.

- 3) Wg Doktorantki, stwierdzono istotną zależność między  $\Delta pK_a$  a toksycznością badanych antracyklin dla linii komórek nowotworowych HCV29T. Jednak współczynnik korelacji  $r=0.427$ , przy  $P=0.099$  nie wskazuje na silną korelację między zmiennymi.
- 4) W odniesieniu do wyznaczonych parametrów walidacyjnych metody UPLC-MS/MS oznaczania pochodnych DOX i DAU w materiale biologicznym, należałoby wyjaśnić, z czym związany był tak wysoki odzysk analitów po ekstrakcji sięgający nawet 126% oraz duży efekt matrycy sięgający 145%.

W pracy można zauważyć drobne błędy, głównie edytorskie, takie jak:

str. 9 – powinno być „ujemny współczynnik aparaturowy”, zamiast „ujemnym współczynnik aparaturowym”

str. 10, wiersz 7 – powinno być „wartość logarytmu współczynnika podziału nie powinna przekraczać 5”, zamiast, „wartość współczynnika podziału nie powinna przekraczać 5”.

str. 37, wiersz 37 – powinno być „iniekcji”, zamiast „inikcji”

str. 52 – AUC obliczono z zastosowaniem „metody trapezów”, zamiast „metody najmniejszych kwadratów”

str. 69 i 70 (Tabela 4.2.) – powinno być „ $\log D_{pH10}$ ”, zamiast „ $D_{pH10}$ ”

Przedstawione uwagi w żaden sposób nie umniejszają oceny merytorycznej pracy, która jest ambitna i nowatorska, a zawarte w niej dane i sposób analizy świadczą o dużej wiedzy i umiejętnościach Doktorantki, nie tylko w zakresie prowadzenia badań laboratoryjnych, ale także analizy in silico metodami modelowania molekularnego.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że recenzowana praca jest oryginalna i dostarcza wielu wartościowych danych dotyczących właściwości fizykochemicznych nowych związków pochodnych antybiotyków antracyklinowych o potencjalnym zastosowaniu w farmakoterapii. Stanowi ona twórczy wkład Doktorantki w rozwój badań nad nowymi cząsteczkami związków leczniczych oraz spełnia kryteria określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65poz. 595 z późn. zmianami). W związkach z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Karoliny Matyjaszczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. farm.  
M. Karażniewicz-Łada