



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

dr hab. Danuta Siluk

Zakład Farmakodynamiki Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki

Al. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk

e-mail: dsiluk@gumed.edu.pl, tel. 58-349-14-94

Gdańsk, 21 czerwca 2019r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Matyjaszyk

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

wykonanej w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET)

pod kierunkiem dr hab. Marii Walczak, prof. UJ.

Właściwości farmakokinetyczne związku, takie jak jego zdolność do przenikania przez błony biologiczne, stopień wiązania z białkami krwi, stopień wchłaniania, dystrybucja, metabolizm, wydalanie czy też stopień toksyczności, są bezpośrednio zależne od jego właściwości fizykochemicznych, opisywanych m.in. poprzez współczynnik podziału i stałą dysocjacji. Stała dysocjacji, zwykle opisywana poprzez wartość pK_a , służy do przewidywania stopnia zjonizowania związku dla wybranej wartości pH, dlatego jest pomocna w badaniach biodostępności czy badaniach farmakokinetyki potencjalnych leków. Z kolei lipofilowość związku, zwykle wyrażana poprzez logarytm współczynnika podziału, $\log P$, lub logarytm ze współczynnika dystrybucji, $\log D$, jest parametrem fizykochemicznym charakteryzującym zdolność związku do przenikania przez membrany, do wiązania z białkami czy do kumulacji w tkankach. Poznanie wyżej wymienionych współczynników dla związków będących kandydatami na leki jest kluczowe na wczesnych etapach badań przedklinicznych leków, gdyż umożliwia przewidywanie zachowania związków w organizmie żywym oraz ułatwia odrzucenie związków o niekorzystnych właściwościach farmakokinetycznych. A to z kolei

pozwała na obniżenie kosztów i skrócenie czasu badań nad lekiem. Ponieważ stale poszukuje się lepszych, bardziej precyzyjnych metod wyznaczania wartości pK_a , $\log P$, czy $\log D$, przedstawiona do recenzji praca doktorska dokumentująca wyznaczanie tych współczynników dla nowych antybiotyków antracyklinowych oraz przedstawiająca ich analizę farmakokinetyczną, wpisuje się w aktualne trendy badań o wysokich walorach poznawczych i praktycznych.

Praca doktorska mgr Karoliny Matyjaszczyk ma układ typowy dla takich opracowań. Rozprawa doktorska jest udokumentowana 34 rycinami, 18 tabelami i przypisami literaturowymi w wysokiej liczbie 164, artykułów naukowych opublikowanych głównie w czasopismach z listy filadelfijskiej. Monografia zawarta jest na 124 stronach i składa się z klasycznie przyjętych części rozprawy doktorskiej. Zawiera niewiele potknięć edytorskich i redakcyjnych, co sprawia, że pracę czyta się z przyjemnością.

Za najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej uważam:

1. Wyznaczenie wartości pK_a dla związków antracyklinowych za pomocą nowoopracowanej metody wykorzystującej technikę strefowej elektroforezy kapilarnej.
2. Wyznaczenie wartości $\log D_{pH10}$ dla badanych związków z wykorzystaniem techniki mikroemulsyjnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej.
3. Wyznaczenie profili farmakokinetycznych nowych związków antracyklinowych w badaniach *in vitro* na myszach oraz parametrów PK w badania *in silico*.
4. Na podstawie przeprowadzonych badań wskazanie, spośród badanych antybiotyków antracyklinowych, kandydata do dalszych etapów badań przedklinicznych.

Wstęp pracy jest rzetelnym wprowadzeniem do zagadnień stanowiących podstawę teoretyczną rozprawy doktorskiej i w sposób ciekawy przeprowadza czytelnika przez tematy związane z właściwościami kwasowo-zasadowymi i lipofilowymi substancji oraz przez dobrze opisane zagadnienia dotyczące antybiotyków antracyklinowych. Lektura wstępu zdradza dobre przygotowanie Doktorantki do prowadzenia badań w wyznaczonym obszarze tematycznym. Dodatkowo, ujawnia łatwość pióra Autorki, co może okazać się przydatne na dalszych etapach kariery naukowej.

Cel pracy został wytyczony precyzyjnie i klarownie. Podzielony został na sześć cząstkowych punktów, których osiągnięcie zostało udowodnione na kolejnych kartach dysertacji.

Rozdział **Materiały i metody** zawiera poprawne spisy badanych związków z rycinami ich struktur chemicznych, z listą stosowanych substancji, odczynników, z opisem wykorzystanej w pracy aparatury i metodyki postępowania dotyczącej wyznaczenia współczynnika dystrybucji i współczynnika podziału oraz wyznaczenia profilu farmakokinetycznego badanych pochodnych antracyklinowych. Rozdział ten zawiera opisy procedur podane w sposób przejrzysty, umożliwiające odtworzenie bogatej części eksperymentalnej doktoratu. Ta część dysertacji wzbudza szacunek wynikający z nakładu pracy związanej z dużą ilością eksperymentów koniecznych do przeprowadzenia, aby osiągnąć postawione w pracy cele. Dodatkowo, różnorodność stosowanych w badaniach technik separacyjnych, niewątpliwie wymagała od Doktorantki solidnego przygotowania i sporej ilości czasu niezbędnego do ich opanowania. Niezbyt często spotyka się prace doktorskie łączące takie techniki jak elektroforeza kapilarna, mikroemulsyjna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna i wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas, dlatego podejście to warte jest zauważenia.

Właściwości fizykochemiczne związków wyznaczane były eksperymentalnie za pomocą nowo opracowanych metod strefowej elektroforezy kapilarnej oraz mikroemulsyjnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej. Chciałabym pogratulować Doktorantce tego osiągnięcia, bo zalicza się ono do niełatwych badań wykorzystujących elektromigracyjne techniki separacyjne i zostało opublikowane w liczącym się czasopiśmie analitycznym, *Journal of Chromatography B* 2017, 1060, 44, w artykule naukowym gdzie pierwszym autorem jest mgr Karolina Matyjaszczyk.

Profil farmakokinetyczny pochodnych antybiotyków antracyklinowych, ich stężenia w osoczu analizowane były z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Należy z uznaniem podkreślić zastosowanie techniki ultrasprawnej chromatografii cieczowej i dobór warunków chromatograficznych umożliwiający ostatecznie na rozdzielenie badanych związków w ciągu 10 min przebiegu chromatograficznego. Trzeba też zauważyć, że objętość wyjściowa osocza do analizy ilościowej była bardzo niewielka, wynosiła 100 μ l. Nie jest to może specjalnym zaskoczeniem ze względu na rodzaj badanych zwierząt, ale biorąc pod uwagę kasetowe

podanie związków oraz konieczność oznaczenia stosunkowo niskich stężeń tych związków w krwi, procedura przygotowania próbki i późniejsza analiza ilościowa stanowiła niewątpliwie spore wyzwanie analityczne.

Analiza metodyki tej części pracy skłania do komentarza i kilku pytań.

- Wydaje się, że dużym ułatwieniem w kwestii identyfikacji badanych związków w przyszłych analizach byłoby wyznaczenie dodatkowego przejścia jonowego, tzw. przejścia jakościowego. Mogłoby ono, obok przedstawionych przejść fragmentacyjnych branych pod uwagę w analizach ilościowych, zmniejszyć niepewność związaną z identyfikacją badanych antracyklin.

- Pojawia się też pytanie o warunki wyboru karwedilolu na standard wewnętrzny? Warto byłoby na chromatogramach pokazać również pik odpowiadający temu związkowi.

Rozdział **Wyniki**, podobnie do rozdziału go poprzedzającego, opisany jest przejrzysto i dobrze ilustruje rezultaty doświadczeń. Zawiera 17 rozbudowanych rycin, w większości złożonych z kilku a nawet kilkunastu mniejszych rycin i z 14 tabel. Rozdział ten zawiera szczegółowe dane opisujące optymalizację metody wyznaczania wykładnika stałej dysocjacji, współczynnika dystrybucji i współczynnika podziału.

I ta część pracy skłania do dyskusji i postawienia kilku pytań.

- Czy na Ryc.4.11 i 4.12, ilustrującej chromatogramy badanych związków antracyklinowych zostały pokazane różne stężenia wzorców, pochodnych doksorubicyny i daunorubicyny?

- Pewną wątpliwość budzą ryciny obrazujące zależność stężenia w krwi od czasu dla badanych związków (Ryc. 4.13 - 4.16). Umieszczone na niej zostały punkty odpowiadające stężeniom obliczonym z krzywej wzorcowej w zależności od czasu, przy czym część punktów znajduje się poniżej najniższego punktu stężeniowego na krzywej kalibracyjnej (LLOQ). Warto byłoby zaznaczyć tę rozbieżność w tekście, ewentualnie na rycinie. Chcę tu podkreślić, że włączenie do obliczeń farmakokinetycznych stężeń obliczonych na podstawie równania opisującego krzywą kalibracyjną a występujących poniżej najniższego punktu na krzywej kalibracyjnej jest dopuszczalne. Jest przedmiotem badań i tematem wiodącym opublikowanych artykułów naukowych znakomitych ekspertów, np., prof. Williama Jusko, który opisuje ten problem w artykule pt. „*Use of pharmacokinetic data below lower limit of*

quantitation values” (*Pharm Res* 2012, 29, 2628). Wątpliwość pewnie byłaby mniejsza, gdyby granica oznaczalności była niższa od LLOQ.

Dyskusja wyników jest rozdziałem napisanym bardzo ciekawie, trafnie wiążąc wyniki uzyskane w trakcie pisania pracy doktorskiej dotyczące głównie właściwości fizykochemicznych antracyklin z obliczonymi parametrami farmakokinetycznymi oraz z dostępnymi właściwościami badanych związków jak ich toksyczność czy właściwości antyproliferacyjne. Autorka cytuje wiele publikacji naukowych, odnoszących się do poszczególnych badanych zagadnień, co dowodzi Jej dojrzałości i umiejętności krytycznej analizy wyników.

Uwag edytorskich czy redakcyjnych jest bardzo niewiele, i nie będę ich tu wymieniać, z wyjątkiem jednej. We wstępie, w rozdziale opisującym kardiotoxyczność antybiotyków antracyklinowych (1.4.4.), pojawiła się dość powszechnie stosowana, choć jednak żargonowa nazwa „beta-blokery”. Pewnie zgrabniej byłoby użyć określenia „beta-adrenolityki”.

Wymienione wyżej uwagi czy komentarze nie obniżają bardzo wysokiej oceny rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Karoliny Matyjaszczyk, która stanowi opracowanie wartościowe zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia. Stwierdzam, że w pełni odpowiada ona warunkom formalnym i merytorycznym stawianym rozprawom doktorskim zawartym w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. – *O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dziennik Ustaw RP nr 65, poz. 595 z dnia 16 kwietnia 2003 r.) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum o dopuszczenie mgr Karoliny Matyjaszczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na bardzo bogaty warsztat badawczy, istotne walory poznawcze i aplikacyjne poruszonych w dysertacji badań, różnorodność zastosowanych technik analitycznych, badań *in silico* oraz badań *in vivo* oraz na fakt wiodącej roli Doktorantki w publikacji uzyskanych wyników w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej (*Journal of Chromatography B*, 2017, IF=2,441), wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy doktorskiej.

A D I U N K T
Zakładu Farmakodynamiki
Katedry Biofarmacji
i Farmakodynamiki GUMed
dr hab. Danuta Siliuk