

Prof. Marek Wesolowski
Katedra i Zakład Chemii Analitycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny

R e c e n z j a

pracy doktorskiej mgr. Jacka Rojowskiego pt.:
Opracowanie autorskiego układu do badań uwalniania substancji biologicznie
aktywnych z wybranych produktów leczniczych i żywieniowych,
wykonanej w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
pod kierunkiem dr. hab. n. farm. Włodzimierza Opoki, prof. UJ

Mgr Jacek Rojowski zajął się konstrukcją i testowaniem oryginalnej aparatury do badania uwalniania substancji aktywnych z różnego rodzaju produktów – farmaceutycznych, środków specjalnego przeznaczenia żywieniowego i żywności. Jest to problematyka aktualna, szczególnie ważna z punktu widzenia oceny jakości leku. Wiadomo bowiem, że dostępność farmaceutyczna określana jako ilość aktywnego składnika farmaceutycznego uwalnianego z danej postaci leku i rozpuszczająca się w otaczającym płynie ustrojowym, np. w soku żołądkowym lub jelitowym, a także szybkość, z jaką proces rozpuszczania zachodzi, odgrywa istotną rolę w ocenie jakości leku i badaniu biorównoważności preparatów, np. leku oryginalnego z generycznym. Kluczowe znaczenie procesu uwalniania substancji leczniczej dla skuteczności terapii wynika z faktu, iż do organizmu wchłania się oraz wywiera działanie farmakologiczne tylko ta ilość aktywnego składnika, która została uwolniona do płynu ustrojowego. Nie wnikając głębiej w te zagadnienie należy potwierdzić, że w przypadku preparatów leczniczych badanie uwalniania aktywnego składnika farmaceutycznego stanowi kluczowy element oceny jakości leku.

Podobnie wygląda sytuacja w przypadku suplementów diety (środków specjalnego przeznaczenia żywieniowego). Intensywnie rozwijający się rynek tych produktów, zarówno w krajach wysokorozwiniętych jak i rozwijających się, dostarcza trudną do określenia liczbę preparatów, których zadaniem jest suplementacja organizmu, np. w przypadku niedoboru

mikroelementów lub witamin, jako preparaty uzupełniające dietę w składniki zapobiegające osteoporozie lub odbudowujące chrząstkę stawową w przypadku różnego rodzaju schorzeń reumatycznych. Reklamie tych preparatów nie towarzyszy jednak informacja, iż z powodu braku odpowiednich badań obejmujących m.in. ocenę zgodności z deklaracją na etykiecie składu jakościowego i ilościowego produktu czy też określenie ilości aktywnego składnika uwalnianego do odpowiedniego płynu ustrojowego, w praktyce bardzo trudno jest dokonać rzetelnej oceny skuteczności tej suplementacji. W związku z powyższym, podjęcie przez Doktoranta badań nad konstrukcją i testowaniem oryginalnej aparatury do badania uwalniania substancji aktywnych z różnego rodzaju produktów spożywczych, w tym suplementów diety, jest wielce pożądanym krokiem we właściwym kierunku.

Dokonując formalnej oceny przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej należy stwierdzić, że licząca 98. stron dysertacja składa się z dziesięciu kolejnych rozdziałów, w tym z Wstępu, Celu pracy, Części doświadczalnej, Opisu metod stosowanych w pracy, Dyskusji wyników oraz Wniosków, Piśmiennictwa i Załączników. Właściwą treść pracy poprzedza strona tytułowa, podziękowania i szczegółowy spis treści. Autor zamieścił w doktoracie również spisy rycin i tabel oraz zestawił skróty i wyrażenia stosowane w pracy. Są one wartościowym elementem rozprawy, pomocnym szczególnie podczas analizy treści kolejnych rozdziałów z uwagi na używaną specjalistyczną terminologię. Korzystniej by jednak było, gdyby wykaz skrótów i akronimów zestawiono w układzie alfabetycznym. Istotnym elementem rozprawy jest również zwięzłe, jednostronicowe streszczenie, w języku polskim i angielskim. Pisząc ten bardzo ważny fragment każdej pracy naukowej, Doktorant wykazał się umiejętnością zawarcia w bardzo krótkim tekście najważniejszych osiągnięć będących efektem własnych badań naukowych.

Przystępując do realizacji zasadniczego celu pracy doktorskiej, mgr J. Rojowski przybliżył czytelnikowi zagadnienia związane z badaniem uwalniania substancji leczniczej z produktu farmaceutycznego. Rozbudowany, ponad 30-stronicowy Wstęp wydaje się jednak uzasadniony z uwagi na konieczność szczegółowego, a przy tym zwięzłego przedstawienia tak istotnych zagadnień, jak dostępność farmaceutyczna i dostępność biologiczna, równoważność farmaceutyczna i równoważność biologiczna oraz korelacja pomiędzy badaniami przeprowadzonymi w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Doktorant wykazał się również wiedzą o metodyce prowadzenia badań uwalniania i aparaturze stosowanej do tego celu, zalecanej przez farmakopee Europejską, Amerykańską i Polską. Omówił też, wraz z zamieszczeniem

odpowiednich rycin aparaty – koszyczkowy, łopatkowy, z ruchomym cylindrem oraz przepływowy.

Kontynuując problematykę uwalniania substancji leczniczych, odrębny podrozdział Doktorant poświęcił badaniom uwalniania substancji odżywczych z żywności i środków specjalnego przeznaczenia żywieniowego. Zwrócił szczególną uwagę na fakt, iż brak obowiązku prowadzenia badań uwalniania substancji z suplementów diety skutkuje brakiem metodyki przystosowanej do tego celu, uwzględniającej ponadto złożoność matryc produktów żywnościowych. Ten właśnie złożony skład matryc suplementów diety, znacznie odbiegający od względnie prostego składu chemicznego preparatów farmaceutycznych, jest zdaniem mgr. J. Rojowskiego podstawowym powodem wymuszającym podjęcie prac nad modyfikacją znanych obecnie sposobów badania uwalniania w kierunku przystosowania ich do badania skomplikowanych matryc o często nieznanym lub trudnym do ustalenia składzie. Doktorant poszedł krok dalej, i postanowił zaprojektować, skonstruować i poddać testowaniu aparat przeznaczony do badania uwalniania substancji aktywnych z żywności i środków specjalnego przeznaczenia żywieniowego, wykorzystując w tym celu wiedzę o aparatach aktualnie używanych do badania preparatów leczniczych – przepływowego i z ruchomym cylindrem. Konsekwencją tego ambitnego celu jest ponadto opracowanie przez Doktoranta i walidacja procedur analitycznych wykorzystywanych do oznaczeń ilościowych w trakcie badania uwalniania, w oparciu o metody instrumentalne, jak dotychczas rzadko stosowane w tym celu, tj. woltamperometrii i absorpcyjnej spektrometrii atomowej.

Materiał faktograficzny przedstawiony w rozdziałach Cel pracy, Część doświadczalna i Opis metod stosowanych w pracy, dobrze dokumentuje wyniki przeprowadzonych prac konstrukcyjnych i badań analitycznych. Jest dowodem na to, że warsztat badawczy został dobrze przygotowany przez Doktoranta i Jego Promotora, Pana Prof. Włodzimierza Opokę, zarówno pod względem praktycznym jak i merytorycznym. Nasuwa się jednak pytanie natury technicznej – dlaczego elementy pracy doktorskiej związane z projektowaniem pompy, układu termostatującego z obiegiem medium do uwalniania, sterowaniem przepływem cieczy, kalibracją pompy strzykawkowej oraz opracowaniem woltamperometrycznej procedury oznaczania prednizolonu i izoniazydu łącznie z testowaniem aparatu za pomocą tabletek Encortolon 5 mg, zostały zamieszczone w rozdziale Cel pracy, a nie w Części eksperymentalnej, która jest właściwym miejscem dla tego typu informacji.

Konstruując autorski układ do badania uwalniania substancji aktywnych z produktów o złożonej matrycy biologicznej, Doktorant wykazał się zdolnościami technicznymi i

umiejętnością projektowania urządzeń składających się z kilku różnych elementów aparatury medycznej. Opanował także inne umiejętności, niż te. typowe dla pracy laboratoryjnej farmaceuty czy analityka. Potwierdza to zaprojektowanie układu pompy strzykawkowej przy pomocy oprogramowania Corel Designer, wykonanie szkieletu pompy z odpowiednio przycinanych elementów aluminiowych, przygotowanie oprzyrządowania służącego do przepuszczania cieczy wychodzącej z pompy strzykawkowej, a także opracowanie sposobu sterowania silnikiem krokowym za pomocą sterownika mikrokrokowego. Wykorzystał w tym celu komputer PC z zainstalowanym systemem operacyjnym Linux CNC, kierując instrukcje do pompy strzykawkowej w uniwersalnym języku programowania g-code. Odpowiednie kody umożliwiające uzyskanie różnych przepływów cieczy zilustrowanych na rycinach 22, 24 i 26 oraz zestawił je w Załącznikach.

Mgr J. Rojowski przeprowadził również badania pozwalające na porównanie wyników uwalniania substancji aktywnych (prednizolonu i izoniazydu), uzyskanych za pomocą nowo skonstruowanego aparatu z aparatem referencyjnym, łopatkowym, a następnie wykorzystał nowo skonstruowany aparat przy zmiennych warunkach przepływu do badania uwalniania Zn do sztucznych soków trawiennych z materiału roślinnego (*Bacoma monieri*) wyhodowanego na różnych podłożach oraz ze sproszkowanych alg, a ponadto do badania uwalniania Zn, Cd i Pb z grzybów (*Boletus badius*) hodowanych na pożywkach wzbogacanych w Cd i Pb. Na uwagę zasługuje fakt, że celem oznaczeń substancji leczniczych i pierwiastków Doktorant opracował bardzo czułą procedurę analityczną opartą na anodowej woltamperometrii strippingowej. Wykonał też walidację tej procedury, wyznaczając takie parametry poprawności pomiarów analitycznych jak liniowość, dokładność wyrażoną jako odzysk, precyzję, czułość wyrażoną jako granice wykrywalności i oznaczalności oraz selektywność. Wyniki oznaczeń pierwiastków porównał z danymi uzyskanymi równoległe za pomocą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej.

Właściwa interpretacja uzyskanych danych znajduje odzwierciedlenie w logicznie i ściśle ujętej dyskusji wyników oraz w wynikających z niej wnioskach. Do najważniejszych osiągnięć Doktoranta należy zaliczyć zaprojektowanie i skonstruowanie aparatu G-flow-2015, przeznaczonego do badania uwalniania substancji aktywnych ze środków specjalnego przeznaczenia żywieniowego i żywności do sztucznych soków trawiennych (żołądkowego i jelitowego), w warunkach imitujących pracę przewodu pokarmowego. Zaletą zbudowanego aparatu jest możliwość prowadzenia badań uwalniania w niewielkiej objętości roztworu oraz w warunkach przepływu wielokierunkowego. Kolejnym osiągnięciem jest opracowanie i

walidacja anodowej i katodowej woltamperometrii strippingowej do analizy mikroelementów i pierwiastków toksycznych w roztworze po badaniu uwalniania. Metoda ta jest korzystna przede wszystkim z uwagi na małą objętość roztworu pobieraną do analizy, niskie granice wykrywalności i oznaczalności pozwalające na analizę śladowych ilości analitu uwalnianego w początkowym etapie badania oraz możliwość analizy substancji organicznych o właściwościach utleniająco-redukcyjnych.

Całości rozprawy doktorskiej dopełnia zamieszczone na końcu pracy piśmiennictwo, z pełnymi tytułami cytowanych publikacji. Obejmuje ono 121. pozycji bibliograficznych, w zdecydowanej większości profesjonalnych prac naukowych i monografii wydanych w języku angielskim. Należy podkreślić aktualność zebranego piśmiennictwa, prawie 60% cytowanych prac została opublikowana w ostatnich dziesięciu latach, tj. w latach 2008-2017. Miarą aktualności piśmiennictwa jest też fakt, iż sześć prac, z których korzystał Autor dysertacji zostało wydanych w bieżącym roku, tj. 2017, a dziewięć w roku 2016. Najstarsza cytowana praca pochodzi z roku 1879, została opublikowana w amerykańskim czasopiśmie *Journal of the American Chemical Society*. Ta praca ma fundamentalne znaczenie dla problematyki badania rozpuszczalności ciał stałych i jest ściśle związana z tematem ocenianego doktoratu. Aktualność zawartych w niej treści i w związku z tym zasadność zamieszczenia tej pozycji w spisie literatury potwierdza też fakt, iż do chwili obecnej była cytowana 1314-krotnie.

Zdumiewający jest jednak sposób zestawienia piśmiennictwa – Doktorant nie przyjął żadnego z powszechnie stosowanych sposobów, tj. alfabetycznego wg nazwisk Autorów publikacji, ani zgodnie z kolejnością cytowania. W związku z tym, dysponując numerem ze spisu literatury trudno jest odnaleźć miejsce w doktoracie, w którym jest dana praca cytowana. Wartości naukowej zebranego piśmiennictwa powinna również towarzyszyć staranność w zapisie danych bibliograficznych. Zdarzają się drobne błędy literowe. np. w tytule czasopisma (poz. 12), niepełne dane bibliograficzne, np. brak roku opublikowania artykułu (poz. 24) lub tytułu czasopisma (poz. 86), albo zupełny brak informacji o wydawcy i roku wydania w przypadku cytowania farmakopei (poz. 73, 111 i 119).

W tekście pracy napotkałem także na drobne usterki redakcyjne – zdarzają się błędy literowe i niewłaściwe końcówki wyrazów. Nie należy stosować terminów „limit detekcji” i „limit oznaczalności” – właściwe terminy to granice wykrywalności i oznaczalności. W tekście na str. 44 i 47 błędna numeracja rycin, ponadto, nie opisano symboli wchodzących w skład wzorów na str. 51. W przypadku cieczy lepiej napisać „próbki o objętości 100 μL ” niż „próbki wielkości 100 μL ” (str. 53). Są to jednak usterki techniczne i nie zmieniają ogólnej,

wysokiej oceny opracowania. Poza tym, układ pracy jest przejrzysty, a rozmieszczenie tabel i rycin prawidłowe. W ogólnej ocenie szata graficzna dysertacji jest staranna.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska przekonuje, że przed rozpoczęciem pracy eksperymentalnej mgr J. Rojowski dobrze rozpoznał od strony teoretycznej i praktycznej problematykę, jaką będzie się zajmował w trakcie realizacji doktoratu. Świadczy o tym nie tylko odpowiednio dobrana i aktualna literatura naukowa, właściwie zredagowany wstęp do doktoratu spełniający swoją rolę również jako uzasadnienie celu badań, ale także współudział w prowadzonych w macierzystej Katedrze badaniach w zakresie uwalniania substancji z różnego rodzaju materiału badawczego, potwierdzony publikacjami w czasopismach naukowych. Działalność konstrukcyjna i badania analityczne oraz uzyskane w ich efekcie wyniki świadczą o dobrym przygotowaniu Autora do prowadzenia badań naukowych. Doktorant swobodnie operuje analityczną terminologią chemiczną, umiejętnie korzysta ze specjalistycznej aparatury badawczej (woltamperometria, absorpcyjna spektrometria atomowa), a ponadto w dużym stopniu opanował umiejętność krytycznej oceny wyników, wykazując się przy tym nie tylko dobrym zrozumieniem zagadnień teoretycznych, ale także doświadczeniem.

Jednym z istotnych elementów potwierdzających poprawność merytoryczną badań wykonanych przez Doktoranta jest też fakt współautorstwa przynajmniej kilku publikacji zamieszczonych w międzynarodowych wydawnictwach naukowych indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports*, tj. w czasopismach z tzw. *Impact factor*. Publikacje te wskazują, iż Doktorant zdobył odpowiednie doświadczenie naukowe uczestnicząc m.in. w badaniach nad oceną wpływu procedur ekstrakcyjnych na uwalnianie cynku oraz związków indolowych z podgrzybka brunatnego do soków trawiennych w warunkach symulujących pracę przewodu pokarmowego (*Food Science Biotechnology*, 2016, IF= 0,699; *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2017, IF= 0,745). Brał też udział w badaniach nad wpływem obróbki termicznej różnych gatunków grzybów jadalnych na uwalnianie jonów cynku do sztucznych soków trawiennych z użyciem anodowej woltamperometrii stripingowej do oznaczania analitu (*LWT – Food Science and Technology*, 2016, IF= 2,329). Fakt publikacji wyżej przytoczonych badań, po pozytywnej ocenie przez niezależnych recenzentów, uwiarygadnia kwalifikacje Doktoranta do prowadzenia prac eksperymentalnych w zakresie opracowania nowego przyrządu do badania uwalniania substancji aktywnych z różnych produktów.

W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej autorstwa mgr. J. Rojowskiego pt. „*Opracowanie autorskiego układu do badań uwalniania substancji biologicznie aktywnej z wybranych produktów leczniczych i żywieniowych*„, 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 z 2014 r., poz. 1852). W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr. Jacka Rojowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk, dnia 24 sierpnia 2017 r.

K I E R O W N I K
Katedry i Zakładu
Chemii Analitycznej GUMed

prof. dr hab. Marek Wesółowski