*Dr hab. Jan Migdalski, prof. AGH*
*Katedra Chemii Analitycznej WIMiC*
*Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie*

*Kraków 30. 09. 2017*

# Recenzja

**rozprawy doktorskiej pana mgr. farm. Jacka Rojewskiego zatytułowanej:**
***„Opracowanie autorskiego układu do badań uwalniania substancji biologicznie aktywnych z wybranych produktów leczniczych i żywieniowych"*,**
**która wykonana została w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem dr hab. Włodzimierza Opoki, profesora UJ.**

Zapewnienie właściwej opieki zdrowotnej dla obywateli powinno być jednym z podstawowych obowiązków każdego państwa. Spełnienie tego zadania stanowi zawsze istotne obciążenie dla budżetu, przy czym niebagatelną część związanych z tym wydatków stanowią koszty refundacji leków (przynajmniej częściowej), tak, aby były one dostępne dla możliwie szerokiej populacji mieszkańców.
Wiadomo, że koszty związane z opracowaniem i wprowadzeniem do praktyki klinicznej nowych specyfików są ogromne, co przekłada się bezpośrednio na wysokie ceny oryginalnych leków pierwotnych. Z reguły po upływie terminu ochrony patentowej obok oryginalnego leku podstawowego pojawia się na rynku cały szereg leków odtwórczych (generyczych), o składzie i postaci zbliżonej lub wręcz identycznej jak lek podstawowy, ale zazwyczaj znacznie tańszych od leku podstawowego. Należy jednak pamiętać, że identyczność składu i postaci nie zawsze przekłada się na podobną skuteczność leczniczą leku odtwórczego - należy to potwierdzić stosownymi badaniami. Zatem optymalizacja kosztów opieki zdrowotnej powinna obejmować między innymi działania prowadzące do wyboru spośród dostępnych na rynku leków generycznych tych, które charakteryzują się biorównoważnością jak najbardziej zbliżoną do leku pierwotnego oraz najkorzystniejszą ceną. Pierwszym, bardzo istotnym etapem w łańcuchu działań mających określić biorównoważność leków są prawie zawsze badania dostępności farmaceutycznej, która określana jest jako ilość aktywnego składnika leku, która uwalniana jest w określonym czasie z danej postaci leku i

rozpuszcza się w płynie imitującym swoim składem płyny ustrojowe (np. sok żołądkowy czy też sok jelitowy). Identyczne profile czasowych zmian stężenia aktywnego składnika uwalnianego z leku generycznego i pierwotnego mogą wskazywać na biorównoważność obydwu preparatów. Proces uwalniania i rozpuszczania aktywnego składnika leku ma bowiem kluczowe znaczenie dla skuteczności terapii, jako że do organizmu wchłania się i wywiera działanie farmakologiczne tylko ta ilość składnika, która rozpuściła się w płynie ustrojowym.

Badania nad uwalnianiem składników aktywnych z różnych postaci leków wykonywane są na całym świecie przy użyciu zunifikowanych, komercyjnych aparatów zalecanych przez farmakopee, np. amerykańską lub europejską (przykładowo, stosowane są aparaty typu łopatkowego, koszyczkowego, z ruchomym cylindrem czy też aparaty przepływowe). Doskonała standaryzacja konstrukcji i parametrów pracy tych urządzeń powala porównywać uzyskiwane przy ich użyciu wyniki, np. dla leków pierwotnych i odtwórczych, ale poważną wadą ograniczającą ich masowe stosowanie (szczególnie w ubogich krajach rozwijających się), jest wygórowana cena.

Wychodząc naprzeciw tym problemom pan mgr farm. Jacek Rojowski podjął się opracowania autorskiej konstrukcji stosunkowo taniego i łatwego do samodzielnego wykonania z ogólnie dostępnych elementów układu do badania dostępności farmakologicznej różnych postaci leków. Ponadto wykazał On eksperymentalnie, że opracowany układ może być stosowany także do badań nad uwalnianiem wybranych składników z produktów znanych na rynku jako suplementy diety lub też środki specjalnego przeznaczenia żywieniowego, których przeznaczeniem jest (przynajmniej z założenia) suplementacja organizmu witaminami, mikroelementami czy też innymi składnikami mającymi poprawiać jakość życia. Suplementy, w odróżnieniu od leków, nie podlegają obowiązkowi uzyskania pozwolenia na dopuszczenie do obrotu, co w praktyce wykorzystywane jest do rejestracji wielu preparatów, np. leków ziołowych jako suplementów. Brak odpowiednich badań pozwalających określić zgodność deklarowanego składu czy też potwierdzających uwalnianie pożądanego składnika sprawia, że praktyczna ocena skuteczności suplementacji jest bardzo problematyczna. Biorąc to pod uwagę wszelkie wysiłki zmierzające do zbudowania układów pozwalających dostarczyć informacji o rzeczywistej skuteczności (lub szkodliwości) suplementów należy oceniać bardzo wysoko. Tematykę taką podjął Doktorant.

Przedstawiona do recenzji praca liczy 98 ponumerowanych stron, utrzymana jest w tradycyjnym stylu i zawiera (obok strony tytułowej, podziękowań, spisu treści, spisu rycin i tabel oraz objaśnień skrótów i wyrażeń stosowanych w pracy) 10 ponumerowanych

rozdziałów zatytułowanych kolejno jako: *Wstęp, Cel pracy, Część doświadczalna, Opis metod stosowanych w pracy, Dyskusja wyników, Wnioski, Piśmiennictwo, Streszczenie, Abstrakt* (w języku angielskim) oraz *Załączniki*. Szkoda, że Autor nie wprowadził numeracji podrozdziałów pracy, ułatwiłoby to jej lekturę.

Pierwszy rozdział, Wstęp, stanowi moim zdaniem doskonałe wprowadzenie do tematyki pracy i zawiera opis tak istotnych zagadnień jak dostępność farmaceutyczna, dostępność biologiczna oraz równoważność farmaceutyczna i biologiczna. Zawiera również opisy możliwych korelacji pomiędzy wynikami badań w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Autor zamieścił także szczegółowe informacje o metodach prowadzenia badań nad uwalnianiem aktywnych składników z różnych postaci leków oraz opisał szczegółowo aparaturę stosowaną w takich badaniach – między innymi aparaturę zalecaną przez farmakopee Europejską, Amerykańską i Polską.

Co istotne, opisał też szczegółowo problemy jakie mogą występować przy prowadzeniu badań uwalniania wybranych substancji z produktów nazywanych potocznie suplementami diety. Podkreślił, że z uwagi na złożony i bliżej niezdefiniowany skład suplementów przy ich badaniu pojawia się cały szereg problemów, które zazwyczaj nie występują w przypadku badania leków. Wstęp kończy skrótowy opis metod analitycznych stosowanych do oceny skuteczności i szybkości uwalniania.

Moje uwagi do tego rozdziału:

- równanie 1, str.12 powinno być objaśnienie użytych tam symboli
- pożądane byłyby bardziej szczegółowe podpisy pod rysunkami (uwaga ta dotyczy wszystkich rysunków zamieszczonych w pracy)
- str. 40 zdanie: *„woltamperometria jest metodą analityczną opartą na pomiarze natężenia przepływu prądu w roztworze.."* jest bardzo nieprecyzyjne. Metody woltamperometryczne to metody analityczne oparte na pomiarze natężenia składowej prądu faradajowskiego związanej z reakcjami redoks oznaczanego składnika - reakcjami przebiegającymi na granicy faz elektrody pracującej z badanym roztworem. Należy pamiętać, że mierzony w obwodzie zewnętrznym prąd zawiera wiele składowych utrudniających uzyskanie poprawnej informacji analitycznej. Rozwój woltamperometrii miał i ma nadal na celu opracowanie metod pozwalających wyekstrahować pożądaną składową faradajowską z sumarycznego prądu, co bezpośrednio przekłada się na czułość oznaczeń.

Rozdział drugi, Cel pracy powinien być moim zdaniem ograniczony do pierwszych 6 linijek tekstu, a opis konstrukcji aparatu powinien zostać przeniesiony do rozdziału trzeciego, to jest

do „Części doświadczalnej", który można byłoby połączyć w jedną całość z rozdziałem IV „Opis metod stosowanych w pracy"

Moim zdaniem przejrzystość pracy byłaby też istotnie polepszona po zmianie kolejności podrozdziałów w takich połączonych rozdziałach III i IV. Po opisie aparatu i opisie wyników kalibracji pompy strzykawkowej (podrozdziały „Projekt aparatu przepływowego do badania uwalniania, Projekt pompy aparatu, Łaźnia z układem termostatującym i obiegiem mediów do uwalniania, Sterowanie przepływem cieczy, Sterownik mikroprocesorowy oraz polecenia g-code, Kalibracja pompy strzykawkowej) powinien być moim zdaniem zamieszczony podrozdział zatytułowany „Przygotowanie aparatury do badania uwalniania" następnie podrozdziały „Materiały wykorzystywane w pracy" oraz „Urządzenia pomiarowe".

Dopiero po nich zamieściłbym podrozdziały „Opracowanie woltamperometrycznych metod oznaczania prednizolanu oraz izoniazydu w czasie prowadzonych badań uwalniania", po nich „Oznaczenie prednizolanu" (str.55), następnie podrozdział „Oznaczenie prednizolanu – walidacja" i dalej podrozdział „Weryfikacja aparatu z zastosowaniem stałej postaci leku Encortolon 5 mg" łącznie z rysunkami 16 i 17, i wnioskami ze str.55.

Następnie umieściłbym podrozdział „Oznaczenie izoniazydu" ze str. 61, po nim pokazałbym rycinę 21 i tabelę 4 ze strony 64, potem rycinę 20, a następnie podrozdział „Eksperymenty dotyczące zmiennych warunków przepływu". Pożądane byłoby też zamieszczenia krzywej przebiegu uwalniania izoniazydu w aparacie referencyjnym.

Dopiero teraz zamieściłbym podrozdziały dotyczące badania uwalniania jonów metali ciężkich „Uwalnianie metali z preparatów żywnościowych i suplementów diety", w kolejności podrozdziały „Mineralizacja i przygotowanie próbek", Oznaczenia jonów kadmu(II), ołowiu(II) i cynku(II) metodami ASA i woltamperometrycznymi, po nich pełny podrozdział „Uwalnianie metali z preparatów żywnościowych i suplementów diety"

Uwagi do tej części pracy:

- str. 44 jest rycina 8, 9 i 11, powinno być rycina 9, 10 i 11
- str. 45 jest rycina 10, powinno być rycina 11
- str. 46 brak odnośnika w tekście do ryciny 12
- str. 47 jest rycina 12 oraz rycina 13, powinno być rycina 13 oraz rycina 14
- pożądane byłoby zamieszczenia zdjęcia zmontowanego układu
- pożądane byłyby bardziej szczegółowe podpisy pod rysunkami 9 - 14
- równania na stronie 51 - powinno być objaśnienie użytych tam symboli

- Ryciny 16, 17, 20, 23, 25 i 27 - jak rozumiem ilości uwalnianego prednizolanu lub izoniazydu oznaczane były metodami woltamperometrycznymi – informacja ta powinna znaleźć się w podpisach pod rysunkami.
- rycina 18 w podpisie powinny być zamieszczone szczegółowe informacje pomiarowe: jaką technikę pomiarową stosowano, dokładne parametry pomiarowe ($E_{Początkowy}$, $E_{Końcowy}$, $E_{zatężania}$, wysokość impulsu, wysokość schodka, czasy $t_P$, $t_W$, $t_{zatężania}$), jaki elektrolit podstawowy był stosowany, jaki stosowano wzorzec prednizolonu, jakie stężenie, jakie były kolejne dodatki wzorca. Jak rozumiem, pierwszy przebieg został zarejestrowany dla czystego elektrolitu podstawowego, bez dodatku prednizolanu. Oprócz niego na rysunku pokazane są przebiegi 15 woltamperogramów, z których przebiegi 9 i 10 minimalnie różnią się wartościami prądu – nie mogę zauważyć tych punktów na zamieszczonym obok przebiegu krzywej kalibracyjnej
- Tabela 5, str.69 wyniki uzyskiwane metodą ASA są w każdym przypadku wyższe od tych uzyskiwanych metodą ASV – może to wskazywać na niecałkowitą mineralizację badanych próbek.
- Tabela 6, str. 69 – jak rozumiem wyniki oznaczeń w soku żołądkowym były uzyskiwane jako pierwsze – należałoby zamienić miejscami kolumny w tej tabeli.

Pożądane byłoby też pokazanie przebiegów woltamperogramów ASV rejestrowanych w trakcie oznaczania zawartości Zn, Pb i Cd – kształt rejestrowanych przebiegów może dostarczyć informacji np. o skuteczności mineralizacji próbek.
- podane w podrozdziale „Oznaczanie jonów kadmu(II) ołowiu(II) i cynku(II)" zakresy potencjałów stosowanych w oznaczeniach w/w jonów wskazują na znaczne przesunięcia potencjałów pików tych pierwiastków, spowodowane najprawdopodobniej przesunięciem potencjału stosowanej elektrody odniesienia.

Muszę tutaj podkreślić, że zamieszczone powyżej uwagi zamieściłem tylko z obowiązku recenzenta - w długiej, bezpośredniej rozmowie z Doktorantem i po przejrzeniu uzyskanych przez Niego wyników przekonałem się, że wszystkie pomiary były wykonane prawidłowo, a ich interpretacja nie budzi najmniejszych zastrzeżeń. Wymienione powyżej niedociągnięcia redakcyjne wynikają zapewne z małego (jak na razie) doświadczenia Doktoranta w sposobach prezentacji wyników pomiarów woltamperometrycznych.

Pracę kończy zwięzłe podsumowanie uzyskanych wyników, przejrzyście sformułowane wnioski końcowe oraz streszczenia jasno opisujące osiągnięte rezultaty.

Cytowana w pracy literatura obejmuje 121 pozycji bibliograficznych, w przeważającej większości prac najnowszych opublikowanych w latach 2008 – 2017. Co istotne, nie

zabrakło w niej również fundamentalnej pracy z roku 1879, dotyczącej problematyki badania rozpuszczalności ciał stałych, to jest tematyki ściśle związanej z tematyką doktoratu. Dowodzi to że pan mgr. Jacek Rojewski bardzo dobrze rozpoznał problematykę, którą zajmował się w trakcie realizacji doktoratu.

Przechodząc do oceny całościowej, do największych i niepodważalnych osiągnięć Doktoranta zaliczam zaprojektowanie i wykonanie we własnym zakresie aparatu G-flow-2015, przeznaczonego do badania uwalniania substancji aktywnych nie tylko z różnych postaci leków, ale także z tzw. suplementów diety, to jest z produktów, które do tej pory badane były bardzo rzadko. Należy mieć nadzieję, że spowoduje to wzrost zainteresowania badaniem takich preparatów i wyeliminowaniem z rynku tych, nie posiadających deklarowanych właściwości.

Wszystkie elementy zbudowanego aparatu kontaktujące się z płynami, Autor wykonał z materiałów wykazujących dobra odporność chemiczną, co umożliwia przeprowadzanie badań uwalniania w różnorodnych środowiskach, także w środowiskach agresywnych chemicznie.

Niewielkie objętości roztworów używanych w trakcie uwalniania w połączeniu z zastosowaniem bardzo czułych metod woltamperometycznych są moim zdaniem kolejną zaletą dzieła i pozwalają wykonywać badania także dla związków uwalniających się w niewielkich ilościach (chociaż w sytuacji odwrotnej tzw. warunki „sink" mogą być trudne do spełnienia).

Istotną zaletą opracowanego aparatu jest także możliwość stosowania różnorodnych warunków przepływu medium, łatwych do zaprogramowania i wizualizacji.

Należy również podkreślić, że Doktorant jest współautorem kilku prac opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych.

Mogę zatem z całym przekonaniem stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pana mgr. farm. Jacka Rojewskiego zatytułowana *„Opracowanie autorskiego układu do badań uwalniania substancji biologicznie aktywnych z wybranych produktów leczniczych i żywieniowych"*, spełnia wszelkie warunki formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim, zawarte w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki" (dziennik ustaw RP z 2014 roku, poz. 1852).

W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medium Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie pana mgr. farm. Jacka Rojewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.