



Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii
im. K. Kaczkowskiego
ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa



dr hab. n. med. i n. zdr. inż. Patrycja Kleczkowska

Tel: (+48 22) 261 853 101;
E-mail: patrycja.kleczkowska@wihe.pl

Warszawa, dn. 3.08.2022 r.

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Mariusza STAŚKIEWICZA
pt. „Assessment of potential impact of cherry flavor on stability of Montelukast
tablets”.**

Stabilność leku stanowi jedną z najważniejszych cech jaka musi być spełniona dla osiągnięcia bezpieczeństwa, skuteczności oraz wysokiej jakości produktu. Podobnie, zanieczyszczenia z degradacji mogą generować możliwe klinicznie istotne działania niepożądane, w ten sposób zwiększając toksyczność leku czy substancji leczniczej. Zmiany stabilności chemicznej są łatwe do przewidzenia i są przeważnie bardziej ilościowe w porównaniu ze zmianami stabilności fizycznej. Zachodzą one głównie pod wpływem działania temperatury, promieniowania ultrafioletowego, czy w wyniku ekspozycji leku na czynniki/środowisko o odczynie pH kwaśnym bądź zasadowym.

Jedną z najbardziej znanych reakcji chemicznej degradacji jest utlenianie, zwane również oksydacją. Reakcja ta obejmuje usunięcie elektrododatniego atomu, rodnika lub elektronu lub przeciwnie – dodanie elektroujemnego atomu lub rodnika. Reakcje utleniające w stanie stałym są zwykle klasyfikowane jako autooksydacja, czyli niekatalizowane utlenianie substratu tlenem cząsteczkowym. Niemniej, samoutlenianie

może zainicjować kaskadę innych reakcji, w której utleniony substrat generuje reaktywne formy, takie jak wolne rodniki, a te dalej atakują dodatkowe cząsteczki substratu i rozprzestrzeniają się w wyniku reakcji, tworząc produkty utleniania. Niestety każda zmiana zachodząca w leku pod wpływem procesów chemicznych niejednokrotnie prowadzi do zmniejszenia lub nawet zniesienia jego efektu terapeutycznego. Stąd, mając na uwadze powyższe, można stwierdzić z pełną świadomością, iż znajomość warunków, które prowadzą do degradacji związku macierzystego, jak i wiedza o całkowitym składzie produktu, włącznie z informacjami dotyczącymi substancji pomocniczych, odgrywa kluczową rolę w jego produkcji. Istotnie bowiem, może ona pomóc w określeniu odpowiednich kontroli podczas produkcji, przetwarzania i przechowywania produktu.

Wokół wyżej wspomnianego obszaru wiedzy oscyluje praca doktorska Pana mgr Mariusza Staśkiewicza, zatytułowana „*Assessment of potential impact of cherry flavor on stability of Montelukast tablets*”. Wybór tematu pracy należy ocenić wysoko z powodów nie tylko związanych z podjęciem się określenia wpływu substancji pomocniczej leku na jego stabilność chemiczną (tu: aromat wiśniowy), ale również ze względu na fakt wskazania przez Doktoranta przydatności, a wręcz – konieczności wykorzystania wskazanych w pracy metod badawczych, co może nie być objęte wymogiem w wytycznych dotyczących podstawowych kryteriów badań trwałości produktów leczniczych.

Układ dysertacji jest prawidłowy i typowy dla prac doktorskich. Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi 84 stronicowe opracowanie, na które składa się 14 rozdziałów. Trzy pierwsze rozdziały obejmują wstęp teoretyczny ze szczegółową charakterystyką właściwości pro- i przeciwutleniających związków fenolowych. Obok części teoretycznej praca zawiera: cel pracy, materiały i metody, wyniki i dyskusję, końcowe wnioski, literaturę, spis rycin i tabel, wykaz używanych w pracy skrótów oraz streszczenia, odpowiednio w języku angielskim i polskim. Na końcu pracy umieszczono ponadto listę publikacji powstałych w oparciu o uzyskane w pracy wyniki wraz ze wskazaniem współczynnika oddziaływania Impact Factor i punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki. Co istotne, wyniki przeprowadzonych badań zostały zawarte w 25 tabelach i przedstawione na 11 rycinach.

Doktorant w sposób szczegółowy wprowadza czytelnika w niezbędne informacje wstępne dotyczące leku Montelukast. W sposób klarowny i precyzyjny zamieszcza informacje dotyczące zanieczyszczeń sulfotlenkiem będących wynikiem utlenienia substancji czynnej wielu leków, w tym Montelukastu. Jednak w rozdziale 3 opisującym właściwości pro- i przeciwutleniające związków fenolowych i flawonoidów, w ocenie Recenzenta koniecznym byłoby jasne powiązanie ww. związków z poddanym ocenie aromatem wiśniowym. Istotnie, brak jest w części merytorycznej rozprawy doktorskiej kilku zdań na temat samego aromatu wiśniowego, który de facto stanowi przedmiot pracy. W przeciwnym razie ma się wrażenie braku płynnego przejścia i powiązania jednego rozdziału z drugim. Co ważne, ową więź między związkami fenolowymi a aromatem wiśniowym odnajduje się dopiero w podrozdziale 3.4, gdzie wprowadzona została wzmianka jakoby flawonoidy stanowiły związki tworzące aromat wiśni, a dalej – w rozdziale 4, opisującym cele pracy.

Podobnie, nie jest jasne przedstawienie w pracy dwukrotnie informacji dotyczącej określenia: i) całkowitej zawartości związków fenolowych, ii) całkowitej zawartości flawonoidów, czy iii) zdolności antyoksydacyjnej. W opinii Recenzenta, podrozdziały z części teoretycznej opisujące wyżej wspomniane, tj. podrozdziały 3.6-3.8, winny stanowić całość z zaprezentowanymi w metodyce podrozdziałami 5.4-5.6.

W dalszej części Autor postawił i zrealizował w pracy kilka celów, aczkolwiek jako główny cel pracy Pan mgr Mariusz Staśkiewicz postawił sobie zbadanie – w aspekcie odporności na utleniającą degradację chemiczną – najmniej stabilnej formułacji tabletek Montelukast zawierających aromat wiśniowy, a dalej ich ewentualną modyfikację. Kardynalny cel pracy odnosi się ściśle do tematu rozprawy i zagadnień, a wraz z celami podrzędnymi - wytycza kierunek prowadzenia badań.

Opis części badawczej rozpoczyna rozdział zatytułowany *Materiały i metody*. Metodyka ma charakter szczegółowy, o ile nie narusza to praw własności intelektualnej. Niemniej opis procedur w początkowej części rozdziału wymaga dopracowania. Faktem jest bowiem, że procedury opisane zostały w trybie rozkazującym, typu „odważ”, „sprawdź zawartość wody”, itp. Tym samym nie zachowano jedności czasu i właściwego trybu biernego. Uwagę Recenzenta przykuwa również brak danych szczegółowych dotyczących wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC bądź RP-HPLC)

wykorzystanej do analizy obecności substancji pokrewnych (podrozdział 5.1). Jednak wydaje się to być raczej przeoczeniem Doktoranta, jako że podobne informacje umieszczone zostały w dalszych podrozdziałach, tj. 5.2 i 5.3.

Pan mgr Mariusz Staśkiewicz w rozdziale *Materiały i metody* wskazał, celem walidacji metody i określenia obecności związków fenolowych w aromacie wiśniowym metodą HPLC z detektorem UV (podrozdział 5.2), że zastosowano jedynie trzy długości fali, tj. 272, 280 i 310 nm. Prawdą jest, że nie wszystkie związki fenolowe wykazują piki na wszystkich trzech długościach fali. W tym miejscu najbardziej wskazaną byłaby długość fali rzędu 210 nm. Stąd moje pytanie co było powodem wyboru takiego zakresu długości fali w ww. badaniach?

Rozdział opisujący uzyskane wyniki badań Pan mgr Mariusz Staśkiewicz rozpoczął od poinformowania czytelnika o tym, iż kompozycja aromatu wiśniowego może różnić się w zależności od producenta, a tym samym aromat wiśniowy może wykazywać właściwości przeciwutleniające bądź charakteryzować się ich brakiem.

W nawiązaniu do powyższej informacji, przedstawiając skład aromatu wiśniowego dwóch badanych partii BN 12054770 oraz BN 1726644, Doktorant wielokrotnie wprowadził zapis, iż analiza ilościowa składników jest zbędna. W tym miejscu pragnę się nie zgodzić. Podawanie powierzchni pod pikiem w miejsce wartości procentowej zidentyfikowanego na chromatogramie związku, jest właściwe dla prac magisterskich nie zaś doktorskich. Ponadto znajomość składu ilościowego może okazać się kluczowa, celem wyeliminowania czy zwykłej świadomości co do obecności i rodzaju składnika, którego nadmiar bądź niedobór może indukować odwrotne działanie całego produktu końcowego. Co ciekawe, mimo zaniechania analizy ilościowej, Autor w swojej pracy potwierdza to twierdzenie na str 47. wyników.

Analizę ilościową i jakościową aromatu wiśniowego z pewnością można wykonać stosując ogólnie dostępne techniki spektroskopowe. Należy do nich między innymi spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H czy ^{13}C NMR, a jeżeli mamy do czynienia z materiałem nierozpuszczalnym w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach deuterowanych, również spektroskopię NMR w ciele stałym (CP/MAS NMR), dzięki którym można obrazować strukturę i dynamikę cząsteczek biologicznie aktywnych. Ponadto ogólnie dostępną i tanią jest spektroskopia fourierowska

w podczerwieni (FT-IR), również dla materiałów trudno rozpuszczalnych/nierozpuszczalnych, która to pozwala w szybki sposób zbadać strukturę poszczególnych cząsteczek oraz składu mieszanin cząsteczkowych. Z powodzeniem w recenzowanej dysertacji techniki te mogłyby być przez Doktoranta zastosowane szczególnie, że istnieją ku temu odpowiednie doniesienia literaturowe (przykładowo: *Gabriela Rios-Corripio & José Guerrero-Beltrán, International Journal of Fruit Science 2020, 20, S2, S145–S163*; *Emanuele Cesprini i inni, Wood Science and Technology 2022, <https://doi.org/10.1007/s00226-022-01401-1>*; *Jakub Brozdowski i inni, Annals of Forest Science (2021) 78: 66*).

W dalszej części Doktorant wykazał, że badany aromat wiśniowy charakteryzuje brak obecności flawonoidów odpowiedzialnych za jego działanie przeciwutleniające, co przedstawiono z wykorzystaniem metody HPLC. Mimo to, późniejsze badania przy użyciu metody spektrofotometrii UV-Vis potwierdziły właściwości antyoksydacyjne. Pan mgr Mariusz Staśkiewicz nie poprzestał na tym, w podrozdziale 6.2.1 opisał wyniki badań, których celem było określenie zawartości MKT2, stanowiącego swoisty wskaźnik degradacyjnej oksydacji Montelukastu, w mieszaninach zawierających dwa odmienne stężenia aromatu wiśniowego vs. witaminę C lub kwercetynę, w czasie odpowiednio 0 dni i po upływie 30 dni. Jak się okazało, żaden z użytych przeciwutleniaczy nie skutkowało redukcją ilości generowanych zanieczyszczeń sulfotlenkiem w przeliczeniu na MKT2. Co ciekawe, aromat wiśniowy w stężeniu 5-krotnie wyższym w porównaniu do stężenia formułacji bazowej spowodował powstanie zdecydowanie większej ilości MKT2, zarówno po czasie 30 dni okresu degradacji chemicznej, jak i na tle formułacji zawierającej jednokrotność aromatu. Niestety w przypadku żadnego z prezentowanych wyników nie została umieszczona analiza statystyczna.

W ostatnim podrozdziale części opisującej wyniki, tj. 6.3, Doktorant podjął się próby oceny stabilności substancji leczniczej i zarejestrowanej formułacji zawierającej różne ilości aromatu wiśniowego (0-200%). Jako wynik Autor wskazał, że badane formułacje zawierające odmienne stężenia aromatu wykazują mniejszą stabilność na warunki degradacyjne aniżeli partie leku Montelukast komercyjnie dostępne. Ponadto wyniki uzyskane dla partii badanych, które nie zawierały bądź zawierały aromat wiśniowy w ilości określonej jako 100%, okazały się być tożsame. Podczas gdy w przypadku partii 200%

aromatu wiśniowego zawartość zanieczyszczeń sulfotlenkiem czy całkowita zawartość procentowa zanieczyszczeń okazała się być zdecydowanie odmienna – wyższa w punkcie czasowym 3 miesięcy i niższa dla 6 miesięcy od chwili rozpoczęcia procesu degradacji oksydacyjnej.

Reasumując, ta część rozprawy doktorskiej została napisana w sposób chaotyczny i raczej fragmentaryczny. Istotnie bowiem, Autor bardziej opisuje uzyskane wyniki aniżeli poddaje je wnikliwej dyskusji.

Zaskakująco, w wynikach wprowadzona jest dodatkowa metodyka związana z uzyskaniem zaskakujących i nieoczekiwanych rezultatów. Oczywiście podjęte ponadplanowe badania są w tym przypadku wysoko cenione, jako że świadczą o dojrzałości Doktoranta i uporze w rozwiązaniu zaistniałego „problemu”. Ponadto stanowi to doskonały dowód nieszablonowego planowania i realizowania badań naukowych. Jednak opisy działania związane z ww. winny być wprowadzone w rozdziale 5, tj. *Materiały i metody*, celem niedezorganizowania pracy.

Reasumując, podjęta przez mgr Mariusza Staśkiewicza tematyka pracy jest bardzo ciekawa i wpisuje się w rozwój nauk farmaceutycznych. Wartym podkreślenia jest, że przeprowadzone i zaprezentowane w pracy badania mają znaczenie kliniczne. Jednak rozprawa doktorska jest napisana w sposób chaotyczny, o czym świadczą powtarzające się elementy strukturalne pracy (jak np. metodyka częściowo zawarta we wstępie i we właściwym rozdziale *Materiały i metody* czy wprowadzenie podrozdziałów metodologicznych w rozdziale prezentującym wyniki pracy). Ponadto niekiedy ma się wrażenie braku związku przedstawionych informacji z tytułem i tym samym tematem pracy.

Inne uwagi i przemyślenia Recenzenta dotyczące dysertacji są następujące:

- wnioski końcowe winny stanowić podsumowanie wyników osiągniętych przez Doktoranta podczas wykonywania pracy badawczej wraz z potencjalną strategią ich zastosowania w przemyśle. Nie powinny zaś stanowić zaleceń dla technologa postaci leku bądź też pracownika Działu Kontroli Jakości zatrudnionych w firmie farmaceutyczno-biotechnologicznej,
- podpis rycin należy umieszczać zawsze pod prezentowaną grafiką,

- formatowanie literatury winno być jednorodne, czego brak w pracy doktorskiej mgr Mariusza Staśkiewicza,
- w tekście odnajduje się nietypowe formy interpunkcji bądź jej całkowity brak, co zdecydowanie nie ułatwia czytelnikowi odnalezienia sensu niektórych sformułowań, zaburza odbiór informacji przekazywanej przez Doktoranta i może prowadzić do niewłaściwej interpretacji tekstu,
- odnajdywane są nieliczne uchybienia stylistyczne i fleksyjne czy gramatyczne, typu „*on Figure*” zamiast „*in Figure*”
- brak rozwinięcia niektórych skrótów użytych w tekście, typu GSH, MOK, LOQ, itp.
- brak wskazania literatury źródłowej w przypadku rycin prezentujących mechanizm powstawania zanieczyszczeń Montelukastu sulfotlenkiem (Ryc. 2-1) czy sulfonami (Ryc. 2-2),
- widoczna różnorodność stosowanej czcionki w tekście. Przykładowo, na stronie 55 pierwszy akapit podrozdziału 6.3 (str. 55) został napisany z wykorzystaniem czcionki typu Times New Roman oraz raczej Arial bądź Calibri,
- w tabelach prezentujących stabilność badanych formułacji, tj. tabelach 6-19 i 6-20, brak wskazania jednostek dla podanych wartości, aczkolwiek jako wprowadzenie do tabel, Autor wskazał, że wartości wyrażone są jako stężenie zawartości odpowiednio zanieczyszczeń sulfotlenkiem i zanieczyszczenia całkowitego (str. 57). Podobnie ma to miejsce w przypadku innych tabelaryzowanych wyników, np. tabela 6-22, 6-24, itp.
- czy była badana różnica w kinetyce rozkładu substancji leczniczej w odpowiedzi na zmienną zawartość aromatu wiśniowego, przy okazji określenia zmian w aspekcie zanieczyszczeń sulfotlenkiem?
- czy Doktorant mógłby wyjaśnić potencjalny powód, dla którego obserwowane były zróżnicowane wartości zanieczyszczeń powstających w produkcie końcowym (tu rycina 6-11) w zależności od punktu czasowego, w którym dokonywany był pomiar? Brak jest bowiem podjętej dyskusji, dlaczego przykładowo w czasie 3 miesięcy produkt zawierający aromat wiśniowy wartości 200% daje więcej zanieczyszczeń aniżeli jest to obserwowane w przypadku tego samego produktu w czasie odpowiednio 6 i 12 miesięcy badań stabilności długoterminowej.

Pomimo wskazanych uwag, całość pracy oceniam pozytywnie. Cel pracy został zrealizowany, zaś uzyskane wyniki mogą stanowić doskonałe preludium do dalszych badań.

Tym samym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Mariusza Staśkiewicza spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669). W oparciu o powyższą opinię, wnioskuję do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pana mgr Mariusza Staśkiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Petycja Wierzbowska". The signature is written in a cursive style with a long, sweeping tail.