



dr hab. n. farm. Bartosz Wielgomas

Gdańsk, 19.04.2019

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farm. Anny Zgadzaj,
pt.: „Ocena wpływu wybranych substancji pomocniczych na
fototoksyczność, fotogenotoksyczność i fotodegradację fluorochinolonów
stosowanych w okulistyce”**

Proces poszukiwania nowych leków, nastawiony ostatecznie na wprowadzenie produktu na rynek, ma dwa podstawowe cele: po pierwsze wykazanie, że lek jest skuteczny a po drugie, że jest jednocześnie bezpieczny. Oba dowody na skuteczność i bezpieczeństwo należy przeprowadzić w oparciu o solidne podstawy naukowe. Nad poprawnością procesu rozwoju i rejestracji nowych produktów leczniczych czuwają agencje rejestracyjne, które wskazują ścieżki i metody badań rozwijanych produktów leczniczych. Badania te z natury rzeczy nie są w stanie objąć wszystkich aspektów bezpieczeństwa związanych ze stosowaniem danego produktu, ale są raczej kompromisem pomiędzy nakładem czasu i środków a ryzykiem wprowadzenia leku o niskiej skuteczności lub/i wątpliwym bezpieczeństwie dla pacjenta. Jednym z kluczowych parametrów jakościowych produktu leczniczego jest trwałość substancji leczniczej w warunkach wytwarzania, przechowywania i stosowania u pacjenta. Degradacja substancji leczniczej przede wszystkim prowadzi może do spadku skuteczności terapeutycznej a po drugie do wzrostu prawdopodobieństwa wystąpienia niekorzystnych efektów zdrowotnych wskutek tworzenia się toksycznych produktów fotodegradacji.

Leki okulistyczne są wyjątkowe z kilku powodów: są aplikowane na bardzo wrażliwy narząd, dlatego lek musi spełniać szereg wymogów jakościowych (izotonia, izohydria, jałowość itd.), nie może wykazywać działania drażniącego a co więcej, w warunkach stosowania substancja aktywna będzie narażona na działanie czynników środowiskowych, przede wszystkim bezpośredniego promieniowania słonecznego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr farm. Anny Zgadziej poświęcona jest badaniom wpływu wybranych substancji pomocniczych na fototoksyczność, fotogenotoksyczność i fotodegradację fluorochinolonów stosowanych właśnie w okulistyce.

Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Badania Środowiska Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem promotora: prof. dr hab. n. farm. Grzegorza Nałęcz-Jaweckiego oraz promotora pomocniczego dr farm. Agaty Skrzypczak.

Rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o cykl trzech publikacji oryginalnych oraz jednej pracy przeglądowej opublikowanej w czasopiśmie krajowym. Prace oryginalne opublikowane zostały w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR): *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology* oraz *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Łączny, pięcioletni współczynnik oddziaływania – *Impact Factor* (IF), dla opublikowanych prac wynosi ponad 10,5. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem a w pracy przeglądowej – jedynym.

Rozprawa doktorska jako zestaw publikacji, które już ukazały się drukiem, została opatrzona przez Autorkę streszczeniem, wstępem, celem pracy a następnie syntetycznym opisem metodyk badawczych i omówieniem wyników. W kolejnym rozdziale przedstawione są wnioski. Załączone są wszystkie prace będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora oraz oświadczenia współautorów wraz z procentowym określeniem udziału w powstaniu tychże prac.

Ocena rozprawy

Z informacji zawartych w oświadczeniach współautorów publikacji wynika, że Pani mgr farm. Anna Zgadziej odegrała wiodącą rolę w projektowaniu, koordynowaniu prac eksperymentalnych, zbieraniu wyników, ich interpretacji oraz publikacji. Niestety nie znalazłem w otrzymanym egzemplarzu rozprawy oświadczeń wszystkich współautorów, dlatego suma udziałów w publikacjach 1 i 3 jest niższa od 100%. Zrozumiałym faktem jest to, że nie wszystkie eksperymenty zostały wykonane przez Doktorantkę osobiście, ale z pomocą specjalistów będących ekspertami w posługiwaniu się wybranymi technikami badawczymi. Obecnie trudno jest realizować ambitne projekty naukowe w pojedynkę, bez zaangażowania innych zespołów naukowych i wykorzystywanej przez nie zaawansowanej infrastruktury badawczej. Uważam, że kooperacja z wieloma specjalistami już na etapie doktoratu pozwala budować właściwe relacje, sieci kontaktów (ang. *networking*) i uczyć pracy w zespole, co w późniejszej karierze zawsze procentuje zwiększoną efektywnością i otwartością na nowe rozwiązania i pomysły a także poszerza możliwości projektowania kolejnych badań. We wszystkich pracach eksperymentalnych, wchodzących w skład rozprawy, wśród autorów znajdziemy przedstawicieli co najmniej trzech jednostek zarówno

31

wewnątrz uczelnianych jak i z innych ośrodków badawczych w kraju. Ten aspekt rozprawy, czyli współpracę naukową w trakcie realizacji badań, oceniam bardzo wysoko.

Wartość naukowa całego projektu doktorskiego mgr farm. Anny Zgadźaj została już doceniona przez zapewne co najmniej 6 recenzentów o międzynarodowej renomie, którzy wyrazili aprobatę dla publikacji 3 artykułów w czasopismach ze wspomnianej listy JCR.

Cykl prac będący podstawą rozprawy doktorskiej mgr farm. Anny Zgadźaj jest bardzo spójny tematycznie a ciąg przeprowadzonych eksperymentów logiczny. Nawet najbardziej skuteczne substancje przeciwbakteryjne mogą okazać się nieprzydatne, jeśli ryzyko wynikające z ich stosowania będzie przewyższać ewentualną korzyść terapeutyczną. Postawione przez Doktorantkę cele pracy – wokół poszukiwania substancji pomocniczych zmniejszających fototoksyczność fluorochinolonów przeznaczonych do stosowania zewnętrznego są zatem jak najbardziej uzasadnione.

W pierwszej publikacji Doktorantka dokonała oceny wpływu obecności substancji promieniochronnych na trwałość ofloksacyny. Wybrała dwa filtry dopuszczone do stosowania w kosmetykach: jeden rozpuszczalny w wodzie (Tinosorb M) a drugi w tłuszczach (Tinosorb S). Co ciekawe, tylko Tinosorb M skutecznie spowalniał proces fotodegradacji ofloksacyny, natomiast obecność wody (10%) w formulacji nie miała wpływu na trwałość substancji aktywnej. Trudności metodyczne na etapie ekstrakcji produktów fotodegradacji z maści uniemożliwiły ich identyfikację za pomocą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas. Po lekturze tej publikacji nasuwają się następujące pytania:

Czy Doktorantka przeprowadziła walidację procesu ekstrakcji i oznaczania ofloksacyny w maści? Jaki był odzysk analizowanej substancji i precyzja oznaczeń?

Badania wykazały, że naświetlany roztwór ofloksacyny (po 3 i 4h) powodował znaczącą cytotoksyczność (Publikacja 1, Fig. 6). Czy obserwowana cytotoksyczność mogła mieć wpływ na wynik testu mikrojądrowego?

W kolejnej serii eksperymentów Doktorantka zbadała wpływ substancji pomocniczych o różnych funkcjach: substancji promieniochronnej – benzofenonu-4 i przeciwutleniacza – kwasu *p*-kumarowego na trwałość i toksyczność czterech fluorochinolonów: cyprofloksacyny, lemfloksacyny, fleroksacyny i klinafloksacyny w roztworach wodnych. W tym miejscu chciałbym dopytać Doktorantkę o klucz, którym posłużyła się w doborze substancji do badań – czy tylko jak wspomina w opisie o wyborze decydowała liczba halogenków w cząsteczce?

Baterii testów toksyczności towarzyszyły jakościowe i ilościowe badania produktów fotodegradacji z wykorzystaniem technik HPLC-PDA i HPLC-MS (QTRAP). Zarówno kwas *p*-kumarowy jak i benzofenon-4 spowalniały proces fotodegradacji cyprofloksacyny natomiast w niewielkim stopniu lub wcale nie działały ochronnie na stabilność pozostałych substancji. Doktorantka we wstępnych eksperymentach stwierdziła brak toksyczności, fototoksyczności i fotogenotoksyczności kwasu *p*-kumarowego jak i benzofenonu-4 (wyniki te nie są przedstawione w publikacjach) w stężeniach stosowanych w eksperymentach. Kwas *p*-kumarowy wykazał działanie ochronne, hamował degradację i zmniejszał toksyczność naświetlanej cyprofloksacyny, ale nie pozostałych substancji. Wpływ kwasu *p*-kumarowego na fotogenotoksyczność był zależny od substancji, np. fotogenotoksyczność roztworu fleroksacyny z kwasem *p*-kumarowym była wyższa niż samej fleroksacyny. Test *umu* nie wykazał protekcyjnego wpływu benzofenonu-4 na komórki *Salmonella typhimurium*, mimo że związek ten znacząco redukował fotodegradację.

W trzeciej pracy oryginalnej, Doktorantka skupiła się na ocenie procesu „zamykania” cyprofloksacyny w jedno- i wielowarstwowych liposomach pod kątem fototrwałości substancji czynnej i toksyczności powstających produktów. Ten interesujący koncept, wykorzystujący unikalne właściwości liposomów, znalazł już zastosowanie w celu zwiększenia biodostępności leków, ale także co udowodniono wielokrotnie, w celu zwiększenia fototrwałości wrażliwych na światło substancji leczniczych. Doktorantka uzyskała jedno- i wielowarstwowe liposomy zawierające cyprofloksacynę w różnych stosunkach ilościowych substancji aktywnej do lipidu. Badania toksyczności oraz fototoksyczności i fotogenotoksyczności przeprowadziła z wykorzystaniem testów: MTT, NRU oraz mikrojądrowego. Celem tych doświadczeń była także identyfikacja produktów fotodegradacji przy użyciu chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas wyposażonym w analizator typu Q-trap.

Co ciekawe, cyprofloksacyna w formulacji liposomalnej wykazywała mniejszą trwałość niż w roztworze wodnym. Bardzo interesującym jest fakt, że w obecności lipidów, profil powstających produktów degradacji był odmienny w stosunku do tego, obserwowanego w przypadku naświetlania roztworów wodnych cyprofloksacyny. Sugeruje to istnienie w tym wypadku innego mechanizmu degradacji. W dyskusji wyników, Doktorantka słusznie podkreśla rolę reakcji wolnorodnikowych szczególnie w układach lipidowych z dużą zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Podsumowaniem cyklu publikacji stanowiących rdzeń rozprawy doktorskiej jest praca przeglądowa opublikowana w Biuletynie Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Autorka, dokonała przeglądu literatury od roku 2012, kiedy Europejska

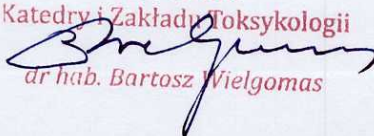
Agencja Leków (EMA) zniosła obowiązek badania fotogenotoksyczności w badaniach przedklinicznych.

Zgadzam się z Doktorantką, że ocena fotobezpieczeństwa jest konieczna dla nowych postaci leków nawet jeśli substancje pomocnicze są stosowane od lat. Jak wykazała w cyklu swoich eksperymentów, przewidywanie fototoksyczności czy fotogenotoksyczności w oparciu o istniejącą wiedzę dla pojedynczych substancji może prowadzić do błędnych wniosków. Wyniki przeprowadzonych przez Nią doświadczeń wskazują, że w zasadzie każda nowa formuła zawierająca nowe substancje pomocnicze powinna przejść badania trwałości i toksyczności. Z punktu widzenia pacjenta, lepiej przyjmować leki, których działania niepożądane są przeszacowane niż niedoszacowane na etapie badań przedklinicznych i klinicznych.

Z obowiązku recenzenta, zgłaszam bardzo nieliczne błędy stylistyczne i edytorskie w kilkunastostronicowym opisie rozprawy, np.: „oczy są wrażliwymi narządami” – oko jest parzystym narządem, potem: tkanki oka myszy a nie „tkanki oczu myszy”. Str. 10 – w teście *umu* oznacza się jednak bezpośrednio nie „ilość” a aktywność, natomiast pośrednio ekspresję/syntezę β -galaktozydazy. Są to drobne uwagi redakcyjne, których nie sposób uniknąć, ale warto dbać o niską ich liczbę.

Podsumowując, opublikowane prace naukowe świadczą o: umiejętności współpracy ze specjalistami różnych dziedzin, opanowaniu warsztatu badawczego, którego znajomość jest najważniejszym osiągnięciem każdego kandydata do stopnia doktora. Doktorantka zapoznała się z metodologią badań toksyczności na komórkach bakteryjnych i ssaczych, technikami wytwarzania liposomów, technikami identyfikacji związków chemicznych (techniki chromatograficzne sprzężone z różnego rodzaju detekcji), metodami statystycznymi i in. O ile wyników eksperymentów nie da się przewidzieć i nie zawsze są one w zgodzie z oczekiwaniami badacza, o tyle umiejętności zdobyte w trakcie eksperymentu naukowego są solidnym fundamentem dalszych prac badawczych.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr farm. Anny Zgadziej spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr farm. Anny Zgadziej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Katedry i Zakładu Toksykologii

dr hab. Bartosz Wielgomas



Gdańsk, dnia 06.05.2019 r.

Pan

Prof. dr hab. n. farm. Piotr Wroczyński

Dziekan Wydziału Farmaceutycznego z
Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

W odpowiedzi na pismo z dnia 22.02.2019 r. dotyczące rozprawy doktorskiej mgr farm. Anny Zgadzaj pt. „Ocena wpływu wybranych substancji pomocniczych na fototoksyczność, fotogenotoksyczność i fotodegradację fluorochinolonów stosowanych w okulistyce”, jako uzupełnienie przesłanej wcześniej recenzji, wnioskuję o wyróżnienie tejże rozprawy doktorskiej. Tematyka pracy ma charakter nowatorski oraz potencjał aplikacyjny i niezwykle istotny z punktu widzenia bezpieczeństwa farmakoterapii. Ponadto wyniki badań prowadzonych w ramach rozprawy zostały już opublikowane w czasopismach z listy *Journal Citation Reports* posiadających wysoki współczynnik wpływu IF – *impact factor* (2 prace w *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* IF 3,337 oraz jedna w *European Journal of Pharmaceutical Sciences* IF 3,869).

Z poważaniem,

Kierownik
Katedry i Zakładu Toksykologii


dr hab. Bartosz Wielgomas