

Prof. dr hab. Janina LULEK
Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Gabrieli WYSZOGRODZKIEJ-GAWEŁ ***Teranostyki zawierające nanoporowate sieci metaliczno-organiczne do zastosowania wziewnego w terapii gruźlicy***

Przedstawiona do oceny rozprawa, firmowana przez Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, została wykonana pod kierunkiem dr hab. Przemysława DOROŻYŃSKIEGO, obecnie pracownika Katedry i Zakładu Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Warszawie.

Omawiana dysertacja jest owocem interdyscyplinarnych badań prowadzonych przez mgr Gabrielę WYSZOGRODZKĄ-GAWEŁ w laboratoriach m.in. Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum i Wydziału Chemii UJ, Instytutu Fizyki Jądrowej PAN oraz współpracy z *Department of Pharmaceutical Science* Uniwersytetu w Perugii. Wymienione miejsca realizacji prac eksperymentalnych wynikają niestety jedynie z afiliacji współautorów publikacji włączonych do rozprawy oraz podziękowań zamieszczonych przez Doktorantkę na pierwszych stronach dysertacji.

Wprowadzenie do praktyki medycznej teranostyki, w której podstawą podejmowania decyzji terapeutycznych jest diagnostyka na poziomie molekularnym, może budzić zasadne nadzieje na obniżenie tempa wzrostu umieralności na skutek nowotworów i innych chorób cywilizacyjnych.

Współczesna technologia farmaceutyczna dąży do osiągnięcia założonego efektu terapeutycznego przy jednoczesnej minimalizacji działań niepożądanych substancji leczniczej. Stąd też, w ostatnich dekadach wiele uwagi poświęca się kontrolowanym systemom terapeutycznym, które umożliwiają dotarcie substancji leczniczej w określone miejsce organizmu, z określoną szybkością i w określonym czasie. Materiały wykorzystywane zarówno w kontrolowanych systemach uwalniania jak i w teranostyce powinny charakteryzować się odpowiednią biogodnością i biofunkcjonalnością oraz możliwie jak najniższą, a najlepiej brakiem toksyczności.

Wymienione wyżej kryteria spełniają, m.in. niektóre homo- i kopolimery poliestrów, czy superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (SPION), a także metaloorganiczne sieci

MOF (*Metal Organic Framework*). Te ostatnie są obiektem szczególnego zainteresowania nauk biomedycznych, ze względu na właściwości sprzyjające ich wykorzystaniu jako nośników leków (duża powierzchnia właściwa, rozwinięta porowatość, biodegradowalność oraz tzw. zdolność oddychania). Dodatkowo, zawierają one mogą w swej strukturze metale obdarzone właściwościami paramagnetycznymi, np. Fe(III), co otwiera drogę do zastosowania tego typu materiału jako środka kontrastującego w diagnostyce opartej o obrazowanie magnetyczno-rezonansowe (MRI).

Jak wynika z najnowszego *Global Tuberculosis Report*, opublikowanego przez WHO w 2019r., mimo wyraźnych tendencji spadkowych, gruźlica pozostaje nadal jedną z 10 głównych przyczyn zgonów na świecie. Jeszcze w 2018r., w skali globalnej chorobę tą zdiagnozowano u 10 mln osób, z których u ok. 5% (0,5 mln) wykazano wielolekową oporność prątków na obecnie stosowane schematy leczenia oparte na stałych i parenteralnych postaciach leku. Nic więc dziwnego, że w odpowiedzi na wzrastającą lekooporność, szczególnie leków I rzutu (rifamycyna, izoniazyd), jednym z kierunków badawczych jest opracowanie formułacji wziewnych, dostarczających cząsteczki substancji aktywnej bezpośrednio do makrofagów pęcherzyków płucnych. Dopłucna droga podania może potencjalnie nie tylko poprawić skuteczność działania (wysokie stężenie leku), ale także zmniejszyć ogólnoustrojową toksyczność i zapobiec wielolekowej oporności prątków gruźlicy.

W tym kontekście, na uznanie zasługuje podjęcie przez Doktorantkę realizacji niezwykle ambitnego planu badań nad opracowaniem nowej teranostycznej formułacji przeciwgruźliczego leku izoniazyd, przeznaczonej do podania wziewnego, w której nośnikiem substancji leczniczej i jednocześnie czynnikiem kontrastowym jest metaloorganiczny materiał Fe-MIL-101-NH₂.

W skład rozprawy wchodzi kolejno: streszczenie w języku polskim (brak wymaganego streszczenia w języku angielskim), wykaz publikacji mających stanowić podstawę nadania Doktorantce stopnia naukowego doktora, lista skrótów, opracowanie zawierające w końcowej części wykaz piśmiennictwa. Ostatnią, moim zdaniem, najważniejszą część rozprawy jest dodatek z ułożonymi chronologicznie odbitkami publikacji współautorstwa Doktorantki.

Trzon ocenianej rozprawy stanowi cykl pięciu (2-10 autorskich) publikacji, które ukazały się w druku na przestrzeni lat 2015-19. Pierwszym autorem każdej z nich jest Doktorantka a autorem korespondencyjnym (tam gdzie wymieniony) jest promotor rozprawy. Wg ogólnie panujących standardów wskazuje to jednoznacznie na wiodącą rolę Doktorantki i promotora w powstaniu omawianych artykułów. Potwierdzenie tej opinii można znaleźć analizując szczegółowy wykaz zakresów prac wykonanych przez poszczególnych współautorów

kluczowej publikacji (I) opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie *Pharmaceutics* w 2019r. Do rozprawy (zgodnie z obowiązującymi wytycznymi Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UJ **dla prac zbiorowych**) dołączone zostały oświadczenia 4 współautorów 2 powyżej pięcio-autorskich publikacji (publikacja I i II). W oświadczeniach zawarta jest zgoda na wykorzystanie wspomnianych artykułów w przewodzie doktorskim mgr Gabrieli WYSZOGRODZKIEJ-GAWEŁ oraz deklaracja, że wyniki zawarte w publikacjach nie zostaną ponownie wykorzystane w innych doktoratach.

Zamieszczone w dysertacji prace zostały opublikowane w czasopismach o uznanej renomie naukowej, tzn. we wspomnianym *Pharmaceutics* (publikacja I,), *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery* (publikacja II), *Pharmaceutical Research* (publikacja III) oraz *Drug Discovery Today* (publikacja IV). Ostatnia pozycja (publikacja V) ukazała się w polskim czasopiśmie *Polimery w Medycynie* (punktacja MNiSW=20). Na uwagę zasługuje IF artykułów I-IV, wynoszący łącznie 18,415. Tak wysoki współczynnik artykułów opublikowanych na poziomie realizacji rozprawy doktorskiej, chyba nie zdarza się często i w związku z tym zasługuje na wyróżnienie.

Obowiązująca Ustawa Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce dopuszcza przedstawienie spójnego tematycznie cyklu publikacji jako podstawy pracy doktorskiej. Mając na uwadze, że poprawność merytoryczna zaprojektowanych badań i eksperymentów a także uzyskanych wyników i ich interpretacji, zawartych w publikacjach I-III oraz wartość merytoryczna i redakcyjna publikacji II i I zostały zweryfikowane przez niezależnych recenzentów w procesie *peer review*, w mojej ocenie dokonam głównie analizy zawartości poszczególnych artykułów pod kątem ich spójności tematycznej.

Wnikliwa lektura prowadzi do wniosku, że cykl przedstawionych prac stanowi spójną całość zarówno w obszarze tematyki (wszystkie dotyczą zagadnień związanych z materiałami metaloorganicznymi i ich charakterystyką), materiału do badań [w pracach eksperymentalnych badania dotyczyły tego samego materiału metaloorganicznego (Fe-MIL-101-NH₂) oraz tej samej substancji aktywnej (izoniazyd)]. Każda kolejna publikacja stanowi kontynuację poprzedniej i dostarcza nowych informacji o przebiegu kolejnych etapów rozwoju pierwszego przeciwgruźliczego teranostyku wziewnego. Niestety pewien dyskomfort w czasie czytania artykułów stanowiło ich uporządkowanie przez Doktorantkę w chronologii czasowej a nie logicznej, dlatego odwrócę tę sytuację i omawianie kolejnych artykułów rozpocznę od pozycji V i IV a skończę na pozycjach II-I.

Pozycje V i IV to prace przeglądowe doskonale wpisujące się w tematykę rozprawy. Autorzy przedstawili w nich istotne informacje na temat mezoporowatych sieci metaloorganicznych w

kontekście m.in. ich możliwych zastosowań w technologii postaci leku (publikacja V) oraz mechanizmów ich przeciwbakteryjnej aktywności (publikacja IV). Wnikliwa lektura obu artykułów pozwala sądzić, że Doktorantka przystępując do badań eksperymentalnych dysponowała znaczną wiedzą na temat właściwości i bezpieczeństwa MOF-ów oraz prób ich wykorzystania jako nośników substancji aktywnych.

Kolejne artykuły (III-I) to kwintesencja ocenianej rozprawy. Praca III prezentuje rezultaty badań wstępnych MOF-u - Fe-MIL-NH₂ jako potencjalnego teranostycznego nośnika leku. Jako modelowa substancja aktywna został wybrany izoniazyd (INH), antybiotyk stosowany od wielu lat w terapii gruźlicy, który jednak coraz częściej nie wykazuje efektu terapeutycznego ze względu na wzrastającą oporność prątków gruźlicy. Uzyskane w badaniach wstępnych wyniki wykazały zdolność badanego materiału do inkorporowania INH oraz do przedłużonego uwalniania zaadsorbowanego leku, a także możliwość wykorzystania Fe-MIL-NH₂ jako kontrastu w obrazowaniu magnetyczno-rezonansowym (publikacja III). W badaniach wstępnych udowodniono również, że cząstki MOF nie wykazują cytotoksyczności i charakteryzują się zdolnością do akumulacji kompozytu w obszarze cytoplazmy komórkowej, co wskazuje na możliwość uwalniania INH wewnątrz komórek i w konsekwencji lokalnej terapii przeciwgruźliczej.

Wynik dalszy badań nad opracowaniem wziewnego systemu teranostycznego do lokalnej terapii gruźlicy płucnej znalazły się w 2 kolejnych publikacjach II i I. Pewne zastrzeżenie budzić może ich zamieszczenie w rozprawie jako dwóch niezależnych artykułów, gdyż „publikacja” II jest w istocie poszerzonym streszczeniem opublikowanym w materiałach zjazdowych zamieszczonych w czasopiśmie *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, a wyniki w niej zawarte (z małymi wyjątkami) znalazły się we wspomnianej kilkakrotnie obszernej publikacji I. Pewien niedosyt powoduje fakt, że kompletując artykuły zamieszczone w dodatku do rozprawy Doktorantka prawdopodobnie zapomniała o dołączeniu do publikacji I również *Supplementary Materials*, zawierających w tym przypadku 3 tabele z wynikami badań. Można się jedynie domyśleć, że brakujące tabele znalazły się również w poniżej omawianym opracowaniu.

Publikacja I zawiera opis krok po kroku praktycznie całego przebiegu opracowania finalnej formułacji stanowiącej mieszaninę mikrocząstek INH-Fe-MIL-NH₂- PLGA i INH-Fe-MIL-NH₂- LC w proporcjach zapewniających jej właściwości aerodynamiczne wymagane dla wziewnych postaci leku, uwalnianie INH w sposób kontrolowany oraz łatwiejsze dotarcie do makrofagów niż samego kompozytu INH-Fe-MIL-NH₂. W pracy przedstawione zostały również kompleksowe wyniki badań *in vitro* (cytotoksyczność, przeżywalność, wychwytywanie komórkowe,

generowanie reaktywnych form tlenu, eksperymenty na fantomach, w tym test możliwości generowania kontrastu w obrazowaniu MR tkanki płucnej) oraz *ex-vivo* na wyizolowanych płucach szczura po podaniu przez tchawicę finalnej formulacji. Komentując tę pracę, należy zwrócić uwagę, że zaprezentowany wachlarz badań niewątpliwie nie mógł być przeprowadzony przez Doktorantkę w pełni samodzielnie, ale wymagał od niej zdobycia co najmniej podstawowej wiedzy w zakresie: zaawansowanych technik analitycznych takich jak m.in. spektroskopia rentgenowska z dyspersją energetyczną (EDX), skaningowa mikroskopia emisyjna (SEM), czy przede wszystkim obrazowanie magnetyczno-rezonansowe (MRI); umiejętności hodowli i przeprowadzania eksperymentów na liniach komórkowych, fantomach tkanki płucnej czy płucach *ex vivo*. Opracowanie końcowego składu formulacji wymagało również znajomości zasad analizy DoE, umiejętności pracy z suszarką rozpyłową, licznikiem cząstek, *Twin-Stage Impinger*'em czy prowadzenia badań uwalniania substancji aktywnej z kompozytów i końcowej formulacji w komorach Franza i probówkach Falcon'a.

Nie będąc wielką entuzjastką formy doktoratu, w skład którego wchodzi cykl spójnych tematycznie prac, z dużym zainteresowaniem podeszłam do tej części ocenianej rozprawy, w której Doktorantka zawarła 65 stronicowe opracowanie. W jego skład wchodzi następujące części: wstęp mający określić celowość przeprowadzonych badań, cel i założenia pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz wykaz piśmiennictwa.

Z satysfakcją mogę stwierdzić, że wstępna część opracowania stanowi niezwykle zwarte kompendium najnowszych danych stanowiących kanwę genezy dysertacji. Czytając kolejne fragmenty dotyczące wyboru: jednostki chorobowej (TB), modelowego leku (INH), możliwości polepszenia skuteczności terapii poprzez jej personalizację i kontrolę nad odkładaniem się leku w płucach (MRI), nośnika leku o właściwościach teranostycznych (MOF) i w końcu drogi podania (wziewna) nabiera się przekonania o słuszności celu pracy przedstawionego w kolejnym punkcie. Jedyne pytanie jakie pojawia się podczas lektury wstępu dotyczy zasadności wybrania jako jednostki chorobowej gruźlicy. Jak wynika ze wspomnianego wyżej najnowszego raportu WHO ponad 50% nowych zachorowań na gruźlicę w 2018r. miało miejsce w Chinach, Indiach i Rosji. Trudno sobie wyobrazić, żeby te państwa jak również wiele innych biednych, często nie objętych szczepieniami krajów mogło sobie pozwolić na zakup projektowanego systemu teranostycznego, tym bardziej, że jego użycie związane byłoby z koniecznością posiadania na miejscu nie najtańszych urządzeń do obrazowania MR.

Na kolejnych stronach Doktorantka określiła cel główny prezentowanej rozprawy, którym miała być, cytując: *ocena możliwości wykorzystania materiału typu MOF o nazwie MIL-101-NH₂ jako nośnika izoniazydu do sporządzania preparatu o właściwościach teranostycznych do podania wziewnego*.

Mając na uwadze fakt, że zrealizowanie powyższego celu badań wymagało przeprowadzenia obszernego zakresu badań preformulacyjnych i formulacyjnych, a także badań *in vitro* i *in vivo*, Doktorantka postanowiła realizować założenia pracy w kilku etapach, podzielonych dodatkowo na szereg podetapów, nie zawsze spójnych z chronologią przebiegu badań przedstawionych w publikacjach III-I. Moim zdaniem, umieszczenie w dysertacji „opracowania” daje doktorantowi możliwość wykazania umiejętności syntetycznego spojrzenia na „swoje” wyniki zawarte we wszystkich publikacjach „doktorskich”. Mam jednak wrażenie, że część opracowania dotyczącego stosowanych materiałów i metodyk byłaby bardziej przejrzysta, gdyby Doktorantka pokusiła się np. o tabelaryczne zestawienie wszystkich typów próbek, w których oznaczano zawartość MOF i/lub INH, sposobu ich przygotowania do końcowej analizy spektrofotometrycznej lub chromatograficznej, składu mediów lub rozpuszczalników użytych do przygotowania krzywych kalibracyjnych, wyników walidacji itp. Znacznie bardziej czytelne są natomiast rozdziały poświęcone prezentacji wyników, dyskusji oraz wnioskom. Szkoda tylko, że w dyskusji omawiając kolejno wyniki badań nie zawsze Doktorantka umieściła odnośnik do właściwej publikacji stanowiącej treść rozprawy. Zestaw 98 cytowanych publikacji jest starannie dobrany i w zdecydowanej większości dotyczy artykułów, które ukazały się na przestrzeni ostatnich lat, głównie w renomowanych czasopismach ujętych w Science Citation Index. Stanowiąc może to rękojmię wysokiego poziomu merytorycznego informacji zawartych w omawianej części opracowania.

Reasumując, z przekonaniem mogę stwierdzić, że Doktorantka w zaprezentowanych publikacjach oraz w opracowaniu potwierdziła swoją znajomość zagadnień związanych z przedmiotem badań oraz umiejętność prawidłowej interpretacji wyników, będących efektem przeprowadzonych eksperymentów.

Do największych osiągnięć Doktorantki, przedstawionych w omawianych publikacjach i opracowaniu zawartym w dysertacji, moim zdaniem zaliczyć należy m.in.:

- wykazanie po raz pierwszy, że możliwe jest wykorzystanie materiału Fe-MIL-NH₂ nie tylko jako nośnika substancji aktywnej w postaci wziewnej, ale również jako środka kontrastującego w obrazowaniu magnetyczno-rezonansowym
- zoptymalizowanie składu jakościowego i ilościowego finalnej formulacji celem zapewnienia wymaganych właściwości aerodynamicznych, kontrolowanego

uwalniania oraz skuteczniejszego wychwytu przez makrofagi pęcherzyków płucnych mikrocząstek INH-Fe-MIL-101-NH₂/PLGA i INH-Fe-MIL-101-NH₂/LC zawartych w opracowanym preparacie

- perspektywę wdrożenia nie stosowanej dotychczas metody kontrastowania MRI z użyciem Fe-MIL-NH₂ w obrazowaniu tkanki płucnej

Mimo bardzo pozytywnej oceny „publikacyjnej” części rozprawy oraz ogólnie pozytywnej oceny opracowania zawartego w dysertacji, podczas lektury pracy nasunęły mi się pytania i wątpliwości, które z pewnością zostaną wyjaśnione lub rozwiane podczas publicznej obrony rozprawy, i tak:

- czy tylko niedopatrzeniem jest brak informacji o uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej na wykonanie badań na szczurach, gdyż nie doszukałam się jej ani w publikacjach, ani w części poza publikacyjnej pracy?
- czy metody analityczne wykorzystywane do oznaczeń zawartości MOF i/lub INH na różnych etapach realizacji pracy były zwalidowane? Jeśli tak, to w jakim zakresie?
- na rycinie 10 str. 2 opracowania oraz na ryc. 6 str.13 artykułu opublikowanego w *Pharmaceutics* przedstawione są profile uwalniania *in vitro* INH z pojedynczych mikrocząstek tj. z INH-MOF-PLGA oraz z INH- MOF-LC a także z końcowej formułacji zawierającej mieszaninę w/w składników do 0,1M roztworu buforu fosforanowego o pH 7,4. W interpretacji wyników pojawia się stwierdzenie o dwufazowym uwalnianiu INH z końcowej formułacji, na co wskazywać ma 34 i 67% uwolnionego leku po 1 i 24 godz. eksperymentu. Czy ta interpretacja jest rzeczywiście słuszna, skoro na rycinach wyraźnie widać zmianę szybkości uwalniania leku z tej formułacji po 72 godz. ?
- czym kierowała się Doktorantka umieszczając w opracowaniu na ryc. 10 str. 2 dodatkowy profil uwalniania (moim zdaniem słusznie)INH z kompozytu INH-MOF?
- dlaczego w badaniach stopnia uwalniania IND z kompozytów IND-MOF, przeprowadzonych w komorach Franza w oznaczeniach ilości uwolnionego analitu inny był skład medium (roztwór PBS=7,4) a inny rozpuszczalnik w roztworach kalibracyjnych (woda) stosowanych w analizie HPLC.?
- czym tłumaczyć ponad 100% ilość uwolnionego INH z kompozytu INH-MOF (ryc. 10, str. 2 opracowania)
- w publikacji I znalazło się chyba kilka chochlików drukarskich, np. na ryc. 3 błędny podpis: 3a to zdjęcia SEM a 3 b to rycina z rozkładem wielkości cząstek
- czym wytłumaczyć zupełnie inny przebieg profilu uwalniania INH z formułacji końcowej (ryc. 1 panel e publikacja II i ryc. 6 publikacja I)? Z informacji zawartych w obu publikacjach wynika, że mamy do czynienia z tym samym materiałem, z tymi samymi warunkami prowadzenia badań i z tą samą końcową metodą oznaczania INH w próbkach identycznego medium?

Pragnę zwrócić uwagę, że pytania i wątpliwości przedstawione powyżej w żaden sposób nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej recenzowanej pracy. Uważam, że Doktorantka w pełni zrealizowała zaplanowany niezwykle ambitny program badań a uzyskane przez nią wyniki zawierają elementy nowości, do których zaliczyć należy m.in. dostarczenie pierwszych

dowodów na możliwość wykorzystania paramagnetycznych nośników MOF jako substancji kontrastujących w obrazowaniu magnetyczno-rezonansowym płuc oraz zaproponowanie wg mojej wiedzy, pierwszej teranostycznej formulacji INH do podania wziewnego (w przypadku jej wdrożenia) dającej możliwość spersonalizowanej terapii gruźlicy.

Podsumowanie

W końcowej konkluzji pragnę wyrazić przekonanie, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, a także umiejętność organizacji i prowadzenia pracy naukowej.

Nie mam również żadnych wątpliwości, że rozprawa doktorska przygotowana przez mgr Gabrielę WYSZOGRODZKĄ-GAWEŁ spełnia warunki określone w artykule 13 ust. 1 Ustawy i może stanowić podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora w *dyscyplinie nauki farmaceutyczne*. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Gabrieli WYSZOGRODZKIEJ-GAWEŁ do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Janina LULEK

Poznań, 2020-07-15