



Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Analitycznej i Biomateriałów
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa



prof. dr hab. inż. Marcin Sobczak

Tel: (+48 22) 57 20 784; E-mail: marcin.sobczak@wum.edu.pl

Warszawa, dn. 24.07.2020 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Gabrieli Wyszogrodzkiej-Gaweł pt. "Teranostyki zawierające nanoporowate sieci metalo-organiczne do zastosowania wziewnego w terapii gruźlicy"

Przedstawiona do oceny praca doktorska pt. "Teranostyki zawierające nanoporowate sieci metalo-organiczne do zastosowania wziewnego w terapii gruźlicy" stanowi kontynuację badań nad innowacyjnymi postaciami leków prowadzonymi od wielu lat przez Zespół Pana Profesora Przemysława Dorożyńskiego.

Jako główny cel pracy, Doktorantka postawiła sobie ocenę możliwości wykorzystania materiału metalo-organicznego typu MOF o nazwie MIL-101-NH₂ jako nośnika izoniazylu do sporządzania preparatu o właściwościach teranostycznych do podania wziewnego.

W wstępie dysertacji, Autorka przedstawiła studium dotyczące gruźlicy, problematyki jej lekooporności oraz nowych koncepcji strategii terapeutycznych. Doktorantka omówiła m.in. koncepcję połączenia diagnostyki i terapii jako nowe podejście medycyny spersonalizowanej przy zastosowaniu wziewnych postaci leków. Magister Wyszogrodzka-Gaweł szczegółowo omówiła znane sieci metalo-organiczne (MOF-y) jako perspektywiczne nośniki mogące być wykorzystane w teranostyce. W stosunkowo krótkim wprowadzeniu dysertacji Doktorantka, cytując najważniejsze źródła literaturowe, bardzo umiejętnie uzasadniła konieczność podjęcia badań stanowiących przedmiot ocenianej rozprawy doktorskiej. Wspomniane we wstępie informacje pozwoliły Doktorantce na przyjęcie założeń niezbędnych do zaprojektowania nowej postaci leku zawierającej izoniazyl (INH). Podjęta przez Doktorantkę tematyka w pełni wpisuje się w aktualne trendy badań współczesnej technologii postaci leku i ma ogromne znaczenia poznawcze.

Pracę eksperymentalną Doktorantka podzieliła na kilka etapów obejmujących: otrzymanie układu MIL-101-NH₂/INH (INH-MOF), opracowanie formulacji do podania wziewnego zawierającej INH-MOF, ocenę właściwości funkcjonalnych opracowanej postaci leku oraz zbadanie oddziaływania w warunkach *in vitro* otrzymanego MIL-101-NH₂ i INH-MOF na wybrane linie komórkowe.

W ramach pierwszego etapu, Doktorantka zsyntetyzowała MIL-101-NH₂ zgodnie z procedurą opisaną przez Bauer'a. Następnie, scharakteryzowała otrzymany produkt metodą XRD. Magister Wyszogrodzka-Gawel słusznie stwierdziła, że przestronne pory wraz ze stosunkowo dużymi oknami sprawiają, że otrzymany MOF może pełnić funkcję nośnika INH. Następnie, Autorka otrzymała metodą inkorporacji układ INH-MOF. Efektywność inkorporacji INH do MOF oszacowała na podstawie wyników analizy FT-IR. Doktorantka wykazała, że całkowita zawartość INH w MOF wynosiła ok. 13% masowych.

W drugim etapie pracy eksperymentalnej, Doktorantka przygotowała formulację do podania wziewnego zawierającą INH-MOF. W tym celu, przeprowadziła analizę czynnikową badając wpływ stężenia MOF-ów, stosunek wagowy mikrocząstek PLGA i leucyny oraz czasu mieszania na właściwości aerodynamiczne cząstek oceniane w odniesieniu do dawki emitowanej oraz frakcji cząstek drobnych – penetrującej do płuc (FPF). Do oceny wpływu wspomnianych czynników na właściwości mieszanki formulacyjnej zastosowała oprogramowanie Design Expert v.8.0.1. W oparciu o przeprowadzoną analizę, Autorka wskazała optymalne parametry, na podstawie których otrzymano składniki INH-MOF PLGA MPs i INH-MOF LC MPs, z których z kolei otrzymano INH-MOF PLGA/LC MPs – „formulację finalną”. Formulacja finalna była mieszaniną mikrocząstek powstałych w wyniku suszenia rozpyłowego dwóch mieszanin INH-MOF z LC oraz PLGA. Następnie, Doktorantka zbadała wybrane właściwości fizykochemicznie otrzymanych formulacji (właściwości aerodynamiczne cząstek, jednolitość zawartości, wielkość cząstek i ich morfologię) oraz wyznaczyła profile uwalniania substancji leczniczej z INH-MOF, INH-MOF LC MPs, INH-MOF PLGA MPs i formulacji finalnej. Zawartość MOF-ów w poszczególnych układach oznaczyła wykorzystując metodę spektroskopii UV-Vis, natomiast zawartość INH stosując metodę HPLC.

W kolejnym etapie pracy eksperymentalnej, Doktorantka przeprowadziła badania biologiczne otrzymanych układów wykorzystując linie komórkowe (fibroblasty L929 i makrofagi myszy RAW 264.7). Na podstawie uzyskanych wyników dokonała oceny żywotności komórek, cytotoksyczności oraz wpływu materiałów na poziom reaktywnych form tlenu (ROS). Oznaczyła również ilość sfagocytowanego INH przez makrofagi RAW po inkubacji z INH-MOF oraz formulacją finalną.

W kolejnym etapie pracy, Doktorantka przeprowadziła badania obrazowania magnetyczno-rezonansowego (MR) wykorzystując fantomy tkanki płucnej wykonane z gąbki celulozowej (która odzwierciedla niejednorodną strukturę tkanki płucnej) zwilżone zawiesiną



MOF-ów w wodzie. Głównym celem eksperymentu obrazowania *in vitro* za pomocą fantomów było oszacowanie czułości kontrastowania w obrazowaniu MR dla bardzo niskich stężeń MOF-ów w wysoce niejednorodnym środowisku naśladującym tkankę płucną. Właściwości kontrastujące formułacji finalnej zostały potwierdzone w eksperymencie *ex vivo* wykorzystując wypreparowane płuca dorosłych szczurów. Doktorantka zaobserwowała, że histogramy obrazów MR płuc szczurów były zgodne z zależnościami ustalonymi w badaniach wykonanych przy użyciu fantomu z gąbki celulozowej.

Doktorantka w ramach przeprowadzonych badań wykazała, że otrzymana formułacja finalna zawierająca INH-MOF charakteryzuje się dobrymi właściwościami aerodynamicznymi i zdolnością penetracji do wnętrza makrofagów. Potwierdziła również w badaniach *in vitro*, że MOF-y nie wywoływały efektu cytotoksycznego i nie hamowały proliferacji fibroblastów L929 nawet w wysokim stężeniu. Dodatkowo wykazała, że MOF-y, INH-MOF i formułacja finalna nie wywoływały znaczącego efektu cytotoksycznego na makrofagi RAW w porównaniu z grupą kontrolną. Doktorantka zaobserwowała, że MOF-y inkubowane z fibroblastami L929 były fagocytozowane co wskazuje, że MOF-y mogą uwalniać substancję leczniczą we wnętrzu komórek. Zaobserwowała również wyższy wychwyty dla formułacji finalnej niż dla INH-MOF. Autorka wykazała w swoich badaniach wzrost poziomu ROS po 24 godzinnej inkubacji z formułacją finalną, co może mieć dodatkowy wpływ na aktywność przeciwgruźliczą INH. Analizując profile uwalniania, Doktorantka wyróżniła kilka poziomów uwalniania substancji leczniczej z nośników: uwalnianie INH z powierzchni INH-MOF PLGA MPs, uwalnianie INH-MOF z mikrocząstek LC i PLGA oraz uwalnianie INH z MOF. Autorka zasugerowała mieszany mechanizm uwalniania – poprzez dyfuzję i degradację. W tym miejscu, mam drobną uwagę krytyczną. Szkoda, że Doktorantka nie dopasowała uzyskanych profili uwalniania do różnych modeli matematycznych (np. modelu kinetyki zerowego i pierwszego rzędu, modelu Higuchi'ego oraz modelu Korsmeyer'a-Peppas'a). Mogłaby wówczas dokładniej przeanalizować i przedyskutować kinetykę oraz mechanizm uwalniania INH z otrzymanych nośników. Zgadzam się całkowicie z Autorką, że wybór PLGA, oprócz aktywacji fagocytozy makrofagów pęcherzykowych, miał zasadnicze znaczenie dla osiągnięcia dodatkowego przedłużenia uwalniania substancji leczniczej z nośnika, a w konsekwencji wydłużenia przebywania INH w płucach w porównaniu do samego INH-MOF. Niestety, nie znalazłem w pracy i załączonych publikacjach szczegółowych informacji dotyczących PLGA użytego w pracy eksperymentalnej. Jak wiadomo, kinetyka uwalniania substancji leczniczych z PLGA zależy od wielu parametrów, m.in. od średniej masy molowej i jej polidispersyjności, zawartości poszczególnych komonomerów w łańcuchu polimeru, średniej długości poszczególnych bloków homo- i heterosekwencji w łańcuchu polimeru, rodzaju enancjomeru laktydu/mieszaniny racemicznej/formy mezo- zastosowanego(ej) w procesie kopolimeryzacji czy stopnia krystaliczności.



Ostatni rozdział pracy stanowią bardzo dobrze sformułowane i logiczne wnioski. Doktorantka stwierdziła, że zastosowanie INH-MOF - jako materiału wyjściowego, zapewnia wstępne przedłużenie uwalniania substancji leczniczej oraz pozwala na nadanie formulacji cech środka kontrastującego do obrazowani MR. Ponadto stwierdziła, że technologia suszenia rozpyłowego, przy zastosowaniu PLGA i leucyny jako substancji pomocniczych, pozwoliła na uzyskanie zoptymalizowanej formulacji charakteryzującej się dobrymi właściwościami aerodynamicznymi, kontrolowanym uwalnianiem INH, dobrym wchłanianiem cząstek przez makrofagi oraz obiecującymi właściwościami kontrastowymi. Ze wszystkimi wnioskami zgadzam się całkowicie. Moja jedyna, drobna wątpliwość dotyczy określenia „kontrolowanego uwalniania”. Oceniając uzyskane przez Doktorantkę profile kinetyczne, użyłbym raczej określenia „formulacji charakteryzującej stosunkowo wysoką kontrolą uwalniania INH”. Niewykluczone, że po dopasowaniu danych eksperymentalnych do modeli kinetycznych, wniosek Doktorantki byłby w pełni uzasadniony.

Z obowiązku recenzenta mam kilka drobny uwag edytorskich.

- 1) Nie jestem przekonany, czy pojęcie „kompozyt” (np. kompozyt INH-MOF) używane przez Doktorantkę jest właściwe. Może zřęczniejsz byłoby używać pojęcie „układ”/”nośnik”?
- 2) W całej pracy oraz załączonych publikacjach nie wyjaśniono symbolu PLGA (czyli kopolimeru laktydu i glikolidu) oraz nie podano jego specyfikacji.
- 3) Sformułowania "stężenie leku/uwalnianie leku" powinno zostać zastąpione określeniem "stężenie substancji leczniczej/uwalnianie substancji leczniczej";
- 4) Sformułowanie „wytworzono” powinno być raczej zastąpione określeniem „otrzymano”.
- 5) Sformułowanie „zawartość ... określono metodą” powinno być zastąpione określeniem „zawartość ... oznaczono metodą”.
- 6) Sformułowanie „intensywność spadła” powinno być zastąpione określeniem „intensywność zmniejszyła się”.

Chciałem podkreślić, że wymienione wyżej drobne uchybienia nie wpływają w istotny sposób na bardzo wysoką wartość merytoryczną niniejszej pracy.

Generalnie, rozprawa doktorska została zredagowana w sposób bardzo staranny. Pracę czyta się dobrze. Układ treści jest bardzo logiczny i spójny. Zakres pracy doktorskiej jest bardzo obszerny. Doktorantka przeprowadziła bardzo dużą liczbę badań strukturalnych, fizykochemicznych, analitycznych i biologicznych. Świadczy to o dużej pracowitości i konsekwencji Autorki. Niektóre z wykonanych badań wymagały dużego doświadczenia, co jest dowodem wysokich kwalifikacji Doktorantki. Pani mgr Gabriela Wyszogrodzka-Gaweł bardzo starannie opisała metodykę prowadzonych badań. Każdy kolejny etap pracy został poprzedzony uzasadnieniem oraz określeniem szczegółowych celów badań. Doktorantka wykorzystwała szereg metod analitycznych, m.in. XRD, FT-IR, UV-Vis, HPLC i MR. Dane eksperymentalne zostały przedstawione w sposób bardzo czytelny i prawidłowo

zinterpretowane. Wszystkie wyniki zostały logicznie skomentowane w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy. Doktorantka dokonała prawidłowej interpretacji dużej liczby danych eksperymentalnych, co świadczy o jej biegłej znajomości wymienionych wcześniej technik badawczych. Chciałbym również podkreślić wszechstronność mgr Gabrieli Wyszogrodzkiej-Gaweł, która w ramach swojej pracy doktorskiej otrzymała teranostyki, przeprowadziła badania strukturalne, fizykochemiczne, biologiczne oraz badania dostępności farmaceutycznej. Chciałbym w tym miejscu również podkreślić, że wyniki badań przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej oraz przegląd literatury dotyczący tematyki dysertacji zostały opublikowane w pięciu artykułach o łącznym współczynniku *impact factor* 18,415. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr Gabrieli Wyszogrodzkiej-Gaweł jest bardzo wartościowym i oryginalnym opracowaniem naukowym. Uzyskane wyniki badań wzbogacają wiedzę w obszarze technologii innowacyjnej postaci leku. Doktorantka wykazała się umiejętnością planowania i wykonywania eksperymentów, interpretowania i krytycznej dyskusji wyników badań oraz formułowania logicznych wniosków.

Reasumując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Gabrieli Wyszogrodzkiej-Gaweł pt. *"Teranostyki zawierające nanoporowate sieci metalo-organiczne do zastosowania wziewnego w terapii gruźlicy"* spełnia wymagania stawiane przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z tym, wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Gabrieli Wyszogrodzkiej-Gaweł do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom merytoryczny, obszerny zakres badań oraz charakter aplikacyjny pracy, wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnieniu rozprawy doktorskiej mgr Gabrieli Wyszogrodzkiej-Gaweł.

KIEROWNIK
Katedry Chemii Analitycznej i
Biomateriałów

prof. dr hab. n. farm. inż. Marcin Sobczak