

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Zgadź pt.:

**Ocena wpływu wybranych substancji pomocniczych na fototoksyczność, fotogenotoksyczność i fotodegradację fluorochinolonów stosowanych w okulistyce**

Jakość i bezpieczeństwo produktów leczniczych nie wynikają wyłącznie bezpośrednio z właściwie przeprowadzonych badań rozwojowych, ale także z ciągłego nadzoru wytwórców nad produktem, sprawowanego w oparciu o analizy ryzyka wynikającego ze stosowania produktu. Produkty lecznicze przeznaczone do oka są szczególną grupą farmakologiczną. Ich stosowanie, z racji drogi podania i miejsca działania, a także właściwości niektórych substancji czynnych (fotolabilność), należy nierozdzielnie wiązać z jednoczesnym wpływem na jakość i bezpieczeństwo produktu czynnika zewnętrznego, jakim jest światło. Prace nad składem jakościowo-ilościowym produktów leczniczych stosowanych w okulistyce, zawierających substancje fotolabilne, w celu zwiększenia ich fotostabilności i powstrzymania procesów degradacji należy zaliczyć do niezwykle istotnych z punktu widzenia farmacji stosowanej, z uwagi na wysokie ryzyko rozkładu substancji czynnych, a zatem zmianę jakości i skuteczności takich produktów oraz ze względu na bezpieczeństwo pacjenta (powstawanie toksycznych produktów fotolizy).

Obiektami badań Doktorantki były substancje czynne z grupy fluorochinolonów, w szczególności cyprofloksacyna (CPX) i ofloksacyna (OFX).

Celem pracy Doktorantki było zweryfikowanie następujących hipotez:

H1. Rodzaj podłoża maści, a także dodatek do maści substancji promieniochronnych, mają wpływ na fotodegradację, fototoksyczność i fotogenotoksyczność fluorochinolonów.

H2. Substancje pomocnicze o działaniu promieniochronnym, antyoksydacyjnym oraz konserwującym mają wpływ na fotodegradację, fototoksyczność i fotogenotoksyczność fluorochinolonów w roztworach wodnych.

H3. Zastosowanie zamykania leku w liposomach ma wpływ na fotodegradację, fototoksyczność i fotogenotoksyczność fluorochinolonów.

Rozprawa stanowi cykl trzech publikacji, w których Doktorantka jest pierwszym autorem, opatrzony obszernym podsumowaniem, na które składają się następujące części: Streszczenie, Wstęp teoretyczny, Cel pracy, Zarys metodologii badań, Omówienie wyników, Wnioski końcowe i Literatura. Całość opracowana jest bardzo czytelnie, w toku podsumowania omawiane są kolejne prace, stanowiące, w takim samym porządku, weryfikację postawionych przez Doktorantkę hipotez. W podsumowaniu Doktorantka odwołuje się do stosunkowo aktualnych 28 pozycji piśmiennictwa, z czego jedna trzecia, to badania z ostatnich 8 lat.

Publikacje stanowiące podstawę rozprawy:

1. Zgadź A et al.: Evaluation of photodegradation, phototoxicity and photogenotoxicity of ofloxacin in ointments with sunscreens and in solutions. *J Photochem Photobiol* (2015); 144: 76-84.

- Zgadżaj A. et al.: „Development of photoprotective, antiphototoxic, and antiphotogenotoxic formulations of ocular drugs with fluoroquinolones. *J Photochem Photobiol* (2018); 178: 210-210.
- Zgadżaj A. et al.: Multi- and unilamellar liposomal encapsulation of ciprofloxacin as ways to modify its phototoxicity and photodegradation. *Eur J Pharm Sci* (2019); 129: 181-189.

Metodyka zastosowana przez Doktorantkę obejmowała, m.in. testy mające na celu wykazanie genotoksyczności i cytotoksyczności produktów fotodegradacji badanych związków, tj.:

- krótkoterminowy test bakteryjny *umu*-test z użyciem szczepu *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002, pozwalający ocenić aktywację genu *umuC*, będącego częścią systemu naprawczego DNA, w odpowiedzi na czynnik uszkodzający. Wynik testu stanowią współczynnik wzrostu (GF) i współczynnik indukcji uszkodzeń (IR);
- test mikrojądrowy z użyciem fibroblastów płucnych chomika chińskiego V79, pozwalający ocenić wpływ czynników uszkodzających na strukturę chromosomów i tworzenie mikrojąder;
- test oceny uszkodzeń DNA z użyciem szczepu *Saccharomyces cerevisiae* D7, pozwalający na wykrycie właściwości mutagennych czynnika uszkodzającego poprzez różnicowanie wzrostu bakterii z mutacją na selektywnych pożywkach;
- testy: enzymatyczny MTT i test wychwytu czerwieni obojętnej (NRU), określające liczbę żywych komórek w hodowli komórek linii V79, eksponowanych na czynnik uszkodzający i, tym samym, określające jego cytotoksyczność.

Kinetyka procesu fotodegradacji była analizowana techniką HPLC z detektorem diodowym lub MS. Do oznaczania produktów fotodegradacji badanych substancji czynnych wykorzystywano ich widma fragmentacyjne uzyskane przy użyciu tandemowej spektrometrii mas.

Naświetlanie próbek przeprowadzono za pomocą symulatora światła słonecznego Suntest CPS+.

Do oceny statystycznej wyników wykorzystano program Statistica.

W pracy 1 badano wpływ dodatku wybranych substancji promieniochronnych (Tinosorb M i S) oraz obecności wody w składzie leku na fotodegradację i jej konsekwencje cyto- i genotoksyczne OFX zawartej w maściach ocznych.

W wyniku doświadczeń, stwierdzono ochronny wpływ tylko Tinosorbu M, nie stwierdzono wpływu wody zawartej w składzie maści na fototrwałość OFX. Zróżnicowanie fizyko-chemiczne produktów fotodegradacji uniemożliwiło ich efektywną ekstrakcję z maści, w związku z czym nie udało się w ramach pracy ocenić ich profili w zależności od modyfikowanych składów maści.

Doktorantka słusznie w omówieniu wyników podsumowała pracę 1 jako potwierdzającą hipotezę 1 o pozytywnym wpływie wybranych substancji promieniochronnych na fotodegradację fluorochinolonów i jej konsekwencje w odniesieniu do bakterii i komórek ssących i, jednocześnie, o braku potwierdzenia wpływu wody jako składnika podłoża maści na powyższe procesy.

Zwrócić uwagę należy na elementy oryginalne, tj.: ocenę fotostabilności OFX w półstałej postaci leku i uwzględnienie w badaniach dwóch substancji promieniochronnych (Tinosorb M i S).

W pracy 2 badano wpływ połączeń związków: promieniochronnego, benzofenonu-4 i antyoksydanta/antymutagenu kwasu p-kumarowego z CPX, lomefloksacyną, klinafloksacyną i fleroksacyną, w roztworach wodnych, na fotostabilność fluorochinolonów.

Najwyższy stopień ograniczenia procesów fotodegradacji i fotoochronne działanie w przypadku komórek bakteryjnych i ssaczy zaobserwowano w mieszaninie kwasu p-kumarowego i CPX. W przypadku wpływu substancji konserwujących, Doktorantka nie potwierdziła ich znaczenia dla fotostabilności fluorochinolonów, powołując się na niepublikowane dane z badań nad chlorkiem benzalkoniowym.

W oparciu o uzyskane wyniki, Doktorantka potwierdziła hipotezę 2 o wpływie zastosowanych substancji pomocniczych na fotodegradację, fototoksyczność i fotogenotoksyczność analizowanych fluorochinolonów w roztworach wodnych, wykazując przy tym wysoki stopień specyficzności kombinacji substancji pomocniczych i czynnych, uwarunkowany określoną strukturą cząsteczki fluorochinolonu, czy długością naświetlania próbek.

Elementem oryginalnym było dobranie jako obiektu badawczego kombinacji CPX z kwasem p-kumarowym i benofenonem-4, nieopisanych dotąd w literaturze.

W pracy 3 Doktorantka podjęła się analizy wpływu form liposomowych na fotodegradację CPX w porównaniu do roztworów wodnych tej substancji o stężeniach stosowanych w okulistyce. Doktorantka wykazała: zależność kinetyki procesów fotodegradacji od stosunku molowego leku do lipidu, wpływ formy liposomalnej CPX na profil produktów fotodegradacji, w zależności od proporcji lek:lipid i od rodzaju liposomu (jedno-, czy wielowarstwowe).

W toku przeprowadzonych doświadczeń udało się zweryfikować hipotezę 3 w zakresie wpływu formy liposomalnej na fotodegradację i fototoksyczność, jednak praca 3 nie wskazuje jasno na zależność zastosowania liposomów i efekty *stricte* genotoksyczne, co w podsumowaniu nie zostało przez Doktorantkę skomentowane.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę zwracają uwagę na niezwykle istotną kwestię konieczności oceny bezpieczeństwa innowacyjnych form nawet znanych leków.

Uwagi:

1. W przeprowadzonych badaniach biologicznych doprecyzowania wymaga kryterium doboru zastosowanych stężeń badanych substancji czynnych w poszczególnych testach (praca 1 – test mikrojądrowy 200mg/l OFX, test z *S. cerevisiae* – 18mg/l OFX; praca 2 – test MTT – 12-1500 mg/l CPX, pozostałe testy bez uzasadnienia; praca 3 – wszystkie testy bez uzasadnienia).

Uzasadnienie zamieszczono jedynie w pracy 1 dla stężeń OFX zastosowanych w *umu*- teście i w pracy 2 dla stężeń substancji promieniochronnych.

2. Pewien niedosyt w ocenie fotogenotoksyczności produktów fotodegradacji badanych substancji czynnych w odniesieniu do komórek ssaczy budzi nieuwzględnienie w teście mikrojądrowym aktywacji metabolicznej. To pominięcie powoduje niepełny obraz genotoksyczności analizowanych związków.

3. Uzupelnienia wymaga tez informacja odnośnie kontroli stosowanych w badaniach, w których naświetlanie wykonywano w obecności materiału biologicznego (zgodnie z opisem metodyki zawartej w podsumowaniu).
4. W opisie testu mikrojądrowego zabrakło wartości indeksu proliferacyjnego (PI), potwierdzającego właściwe stężenie cytochalazyny B, kluczowe dla testu mikrojądrowego oraz uzasadnienia 16 godzin ekspozycji na cytochalazynę B (łącznie z czasem ekspozycji na czynnik 3 godziny, czas od momentu ekspozycji do zebrania komórek wynosi 19 godzin). Zgodnie z wytycznymi OECD, zalecana jest zbieżność tego czasu (tu: 19 godzin), z czasem trwania 1,5 do 2,0 cykli komórkowych. Oba parametry są krytyczne dla uzyskania miarodajnych wyników testu (prace 1-3).
5. Ze ścisłym wyznaczeniem PI wiążą się też stężenia badanych tym testem substancji. Zgodnie z wytycznymi OECD TG 487, powinny być one tak dobrane, aby cytotoksyczność w najwyższym stężeniu nie była wyższa niż  $55 \pm 5\%$ , a indeks proliferacyjny, przy zastosowaniu wersji testu z blokowaniem cytokinezy wynosił więcej niż 1,5. W pracach 1 i 2 badane fluorochinolony powodowały zahamowanie proliferacji komórek nawet do poniżej 30%, a w pracy 2 wyraźnie widać, że poddawanie komórek linii V79 działaniu CPX (Fig. 6) po 60 i 90 minutach naświetlania generowało znaczącą redukcję liczby komórek dwujądrowych, obniżając indeks proliferacyjny, co wpływa na miarodajność testu.
6. W podsumowaniu publikacji, opracowanym przez Doktorantkę, zabrakło porównawczej analizy stężeń badanych substancji czynnych, wywołujących efekty genotoksyczne w komórkach bakteryjnych i ssaczy. Operowanie stężeniami obrazuje stopień aktywności genotoksycznej związków, przydatny zwłaszcza w układzie porównań między nimi i stwarza pole do dyskusji z wynikami innych autorów.

#### Podsumowanie

Powyższe uwagi nie podważają wykazanej w pracach Doktorantki fotogenotoksyczności badanych antybiotyków i możliwości zabezpieczania fotolabilnych substancji przez modyfikację składu maści, czy formy fotolabilnych substancji czynnych (zamykanie w liposomach). Przeprowadzone eksperymenty zostały właściwie zaprojektowane, z uwzględnieniem właściwości poszczególnych stosowanych substancji w przygotowywaniu prób (np. dobór solwentów dla badanych fluorochinolonów uzależniony od osmolarności środowiska, czy dobór linii komórkowej w oparciu o jej wrażliwość na fototoksyny – praca 3). Uwzględnianie powyższych szczegółów o istotnym wpływie na wynik eksperymentu świadczy o solidnym przygotowaniu warsztatowym Doktorantki i bardzo dobrej znajomości literatury, z jednoczesną umiejętnością stosowania posiadanej wiedzy w praktyce.

Zastosowanie w badaniach z substancjami fotoochronnymi związków z tej samej grupy fluorochinolonów, różniących się stopniem fotolabilności i strukturą chemiczną (praca 2) świadczy o wnikliwości Doktorantki i chęci określenia specyficzności badanych substancji fotoochronnych w poszukiwaniu optymalnych połączeń z fotolabilnymi antybiotykami.

Doktorantka komentuje i szuka wyjaśnienia dla wszystkich uzyskanych wyników, ale także dla niepowodzeń w doświadczeniach, jak np. trudności w ekstrakcji produktów fotodegradacji OFX z maści (praca 1). To duża zaleta.

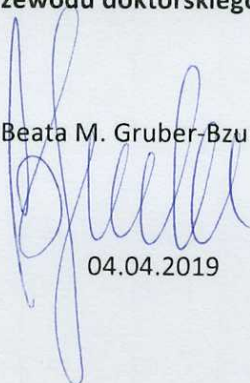
We wszystkich pracach zwraca uwagę właściwie poprowadzona dyskusja wyników, w każdym przypadku trafnie wsparta literaturą. Podkreślić należy też umiejętność poprawnego wnioskowania.

Jakość prac, bogactwo metodyczne i zwracające uwagę połączenie umiejętności stosowania metodyki chemicznej, jak i metod, z bezpośrednim wykorzystaniem różnorodnego materiału biologicznego (bakterie i komórki ssacze), a także sposób przedstawienia wyników z opracowaniem statystycznym zostały słusznie docenione w czasopismach, w których publikacje stanowiące podstawę rozprawy się ukazały – wszystkie ze współczynnikiem oddziaływania IF.

Podkreślenia wymaga wysoki stopień użyteczności pracy w zakresie poprawy skuteczności i bezpieczeństwa maści do oczu zawierających substancje fotolabilne, co znacząco podnosi jej wartość.

**Praca spełnia ustawowe warunki stawiane rozprawom doktorskim. Na jej podstawie, wnoszę o dopuszczenie mgr Anny Zgadzaj do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Dr hab. n. farm. Beata M. Gruber-Bzura, prof. instytutu



04.04.2019