

dr hab. Bożena Karolewicz
Katedra i Zakład Technologii Postaci leku
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
ul. Borowska 211a; 50-556 Wrocław
tel. (71) 784 03 24, faks (71) 784 03 17
bozena.karolewicz@umed.wroc.pl

Wrocław, 20 stycznia 2021 r.

OCENA

**rozprawy doktorskiej mgr farm. Agnieszki Chodkowskiej
pt. „Ocena aktywności przeciwnowotworowej półstałych formułacji z Trichostatyną A”**

**wykonanej pod kierunkiem naukowym promotora prof. dr hab. Macieja Meleckiego –
Kierownika Zakładu Farmacji Stosowanej Wydziału Farmaceutycznego WUM**

Znaczenie problematyki podjętej w recenzowanej rozprawie

Odnutowywane działania niepożądane pojawiające się podczas konwencjonalnego leczenia nowotworów, zachęcają do poszukiwania nowych alternatywnych metod leczenia, do zastosowania również w skojarzeniu z innymi sposobami terapii tj. np. radioterapia czy hormonoterapia. Miejscowo stosowana postać leku jest postrzegana jako nieinwazyjna forma podania substancji w terapii nowotworów, szczególnie w sytuacji terapii pacjentów, u których nie możliwe jest przeprowadzenie operacji chirurgicznej czy stosowanie konwencjonalnej chemioterapii ogólnoustrojowej. Opracowywanie postaci leku dla miejscowego stosowania substancji o potencjale przeciwnowotworowym, mogących przenikać przez warstwę rogową naskórka i dostarczać lek go głębszych warstw skóry, jest ważnym, rozpatrywanym kierunkiem rozwoju technologii nośników substancji czynnych w onkologii.

W tym kontekście mgr farm. Agnieszka Chodkowska, w swojej rozprawie na stopień doktora nauk farmaceutycznych, zajęła się opracowaniem półstałych formułacji z trichostatyną A, substancją o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym, wraz z oceną aktywności wyselekcjonowanych formułacji *in vivo*. Jest to niewątpliwie zagadnienie naukowe aktualne i istotne w kontekście rozwoju nowych możliwości terapeutycznych i nowych nieinwazyjnych dróg podawania substancji czynnych w terapii nowotworów.

Metodyka badawcza (założenia, cel, metody)

Celem głównym recenzowanej pracy było opracowanie receptury półstałych formułacji z trichostatyną A do stosowania na skórę. Etapy realizacji celu obejmowały:

- ocenę właściwości organoleptycznych formułacji w aspekcie ich przydatności do aplikacji miejscowej,
- ocenę i porównanie dostępności farmaceutycznej substancji z projektowanych formułacji,
- wybór optymalnych formułacji do oceny aktywności przeciwnowotworowej *in vivo* u myszy z przeszczepionym nowotworem Balb/c.

W metodyce prac doświadczalnych Doktorantka wyodrębniła 2 etapy prac doświadczalnych, etap preformulacyjny obejmujący opracowanie receptur, przygotowanie formułacji i badania dostępności farmaceutycznej substancji oraz etap drugi - oceny aktywności przeciwnowotworowej *in vivo* wyselekcjonowanych formułacji. W pracy do analizy organoleptycznej zaproponowano 24 receptury, z których po ocenie wyglądu, rozsmarowalności i konsystencji, do dalszych badań uwalniania wytypowano 18 formułacji. W ocenie dostępności farmaceutycznej do oznaczenia uwolnionej trichostatyny A zastosowano 2 metody analityczne: spektrofotometrię UV-Vis i zaawansowaną metodę LC-MS/MS. W części dotyczącej oceny aktywności przeciwnowotworowej *in vivo* Doktorantka badała 4 półstałe formułacje wyselekcjonowane w etapie pierwszym i oceniała po miejscowej aplikacji u myszy z przeszczepionym podskórnie nowotworem mięsaka mysiego. W badaniach analizowano przyrost wielkości guzów u myszy w stosunku do nieleczonej kontroli, czy myszy z nowotworem którym podawano substancję w iniekcji, dodatkowo oceniano stan nawilżenia skóry i przelnaskórkową utratę wody u myszy z przeszczepionym nowotworem.

Zastosowane metody zostały prawidłowo dobrane, zapewniając poprawną realizację i ocenę zakładanych celów.

Struktura rozprawy

Praca obejmuje ogółem 139 stron włączając materiał graficzny i streszczenie pracy w języku polskim i angielskim. Rozprawa zawiera spis treści, wykaz stosowanych skrótów oraz 13 rozdziałów, w tym 1 i 2 rozdział obejmujące odpowiednio: rozdział 1 - 40-stronicowe teoretyczne, obszernie wprowadzenie do zagadnień dotyczących epidemiologii i terapii nowotworów i rozdział 2 - 22-stronicowe omówienie stosowanych w terapii onkologicznej postaci leków i dróg ich podawania (sumarycznie stanowiące około 45% całości pracy). Kolejno rozdziały 3-13 opisują: cel pracy, metodykę, wyniki badań, dyskusję wyników, wnioski (sumarycznie 55 stron, około 40% całości pracy), spis piśmiennictwa, spis tabel i rycin oraz wspomniane streszczenia w dwóch wersjach językowych, dodatkowo opatrzone streszczeniem

graficznym. Zaprezentowany materiał został zilustrowany 13 rycinami (włączając streszczenie graficzne) oraz 14 tabelami.

Wykorzystane piśmiennictwo

Autorka przytoczyła 191 pozycji piśmiennictwa, które obejmują publikacje naukowe (118 pozycji, ponad 60% cytowanego w pracy piśmiennictwa), publikacje książkowe (10 pozycji), dane epidemiologiczne z platform gromadzenia danych i strony towarzystw naukowych (4 pozycje), rejestry medyczne, karty charakterystyk produktów leczniczych oraz certyfikaty analityczne producenta surowca farmaceutycznego (59 pozycji) odzwierciedlające na dzień dzisiejszy stan wiedzy z zakresu poruszanego w dysertacji zagadnienia. W części teoretycznej obejmującej 2 obszernie rozdziały Doktorantka przeprowadziła gruntowną analizę źródeł, przytaczając 157 pozycji piśmiennictwa. Publikacje dotyczące podejmowanej tematyki wydane po roku 2014 stanowią ponad 40% ogółu cytowanego piśmiennictwa (82 pozycje piśmiennictwa), co przy dynamice regulacji i obiegu wiedzy w nauce z obszaru technologii postaci leku jest w pełni zadowalającym wskaźnikiem.

Szczegółowa ocena merytoryczna poszczególnych części rozprawy

Rozdział 1. stanowiący obszerny wstęp do recenzowanej dysertacji doktorskiej zawiera wszystkie istotne dla rozprawy elementy, co wprowadza czytającego w zagadnienie epidemiologii i podziału nowotworów, charakteryzując w szczególności nowotwory skóry oraz obecne możliwości ich terapii, co istotne opisując również substancje stosowane w trakcie badań eksperymentalnych i leki nowej generacji. Tak szerokie ujęcie tematu z uwzględnieniem danych z badań biologicznych nad trichostatyną A pozwala czytającemu zapoznać z motywami pracy i genezą podjętego tematu. Kolejny rozdział teoretyczny, rozwija i opisuje postaci i sposoby podawania leków w terapii onkologicznej, ważne dla planowania prac preformulacyjnych nad postacią z trichostatyną.

W rozdziale 3. Doktorantka po teoretycznym wprowadzeniu wskazuje na główne cele badawcze pracy.

W następnym rozdziale 4., zostały wymienione materiały, aparatura, opisane składy wszystkich formułacji wraz z ich przygotowaniem oraz metody badań farmaceutycznych i badań na zwierzętach. Rozdział kończy opis testów wykorzystanych do oceny różnic i istotności statystycznej otrzymanych wyników badań biologicznych.

Rozdział 5. przedstawia w pierwszej części podsumowanie oceny organoleptycznej 24 formułacji oraz zebrane w formie tabel i rycin dane badawcze z badań dostępności

farmaceutycznej trichostatyny A z wybranych 18 formułacji, gdzie uwolnioną substancję oznaczano dwoma metodami analitycznymi. W drugiej części rozdziału przedstawiono czytelnie w formie tabel i rycin wyniki oceny przeciwnowotworowej *in vivo* u myszy z przeszczepionym nowotworem, 4 wyselekcjonowanych w badaniach *in vitro* formułacji powstałych z trichostatyną A.

Rozdział 6. „Dyskusja” zawiera autorskie podsumowanie badań wraz z odniesieniami do bieżącego piśmiennictwa światowego. Doktorantka w tej części podjęła dyskusję naukową wraz ze wskazaniem korzyści wynikających ze stosowania miejscowej drogi podania substancji o działaniu przeciwnowotworowym, w szczególności wskazując na ocenę *in vivo* formułacji zawierających inhibitory deacetylaz histonowych, rozpatrywanych jako nowe substancje o potencjale do zastosowania w terapii nowotworów. Na podkreślenie zasługuje opracowanie przez Doktorantkę i wyselekcjonowanie na podstawie oceny właściwości fizykochemicznych, formułacji z trichostatyną A do badań aktywności *in vivo*, co wskazuje na dojrzałość naukową Autorki i kompleksowe podejście do tematu, skutkujące w efekcie rozwiązaniem problemu badawczego.

Rozdział 7. zawiera 3 wnioski wyprowadzone z przeanalizowanego materiału badawczego, z czego 1 stanowi podsumowanie właściwości fizykochemicznych analizowanych formułacji i 1 oceny biologicznej miejscowej aplikacji trichostatyny A z rekomendacjami do dalszej oceny w zastosowaniach klinicznych w onkologii.

Po lekturze rozprawy, w mojej ocenie wskazane cele rozprawy zostały osiągnięte i podsumowane przez Doktorantkę w formie wniosków.

Język i formalna strona rozprawy

W przedłożonej rozprawie doktorskiej poprawność stosowania zasad dla odsyłaczy bibliograficznych nie budzi moich zastrzeżeń. Znaleziono omyłkowo zacytowane dane i usterki językowe (niepoprawne użycie danych odnośnie liczby zgonów 99 9644 zamiast 99 964 str. 6; omyłka w zdaniu „Miejscowe preparaty z 5-fluorouracylem są do” zamiast „Miejscowe preparaty z 5-fluorouracylem stosowane są do” str. 23; omyłki we fragmencie tekstu na str. 27; użycie „nie drobnokomórkowym” zamiast „niedrobnokomórkowym” str. 39; omyłka pisarska w zdaniu „przechowywać produkt w stanie wysuszonym w -20°C” zamiast przechowywać produkt w stanie wysuszonym w temperaturze -20°C” str. 66; użycie angielskich nazw substancji czynnych np. methotrexate, gabapentin itp. str. 111, 112), których charakter można uznać za mało istotny dla zawartości pracy.

Biorąc pod uwagę wysoką jakość merytoryczną pracy, z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na kwestie użytych w pracy sformułowań:

1. Niefortunne użycie sformułowań czy określeń w części badawczej:
 - „formulacje bez zawartości TSA” w mojej opinii lepiej byłoby użyć sformułowania „formulacje placebo”;
 - „na najniższych obrotach 0 ” prawidłowo należy wykorzystać sformułowanie „na najniższym poziomie obrotów 0”;
 - użycie określenia „emulsjo żel o/w” właściwiej było użyć sformułowania „emulżel o/w”, czyli emulsja typu o/w wprowadzana do bazy żelu;
 - użycie sformułowania „aparat system miksujący” na określenie miksera recepturowego czy unguatora;
 - „miejscowy system dostarczania nano leków” na określenie zastosowania liposomów jako nośników substancji czynnych str. 112,

i przedstawić do dyskusji w toku obrony następujące zagadnienia:

2. Czy Doktorantka w toku badań sporządziła krzywe wzorcowe do metod oznaczania trichostatyny A metodą spektrofotometryczną i z wykorzystaniem techniki LC/MS-MS, ponieważ w pracy o tym nie wspomniano?
3. Jakimi kryteriami posługiwała się Doktorantka przy ocenie konsystencji i rozsmarowywalności uzyskanych formułacji, dokonując ich selekcji do badań dostępności farmaceutycznej?
4. W zestawieniu z uzyskanymi najlepszymi wynikami dostępności farmaceutycznej trichostatyny A z formułacji żelowych i w efekcie opisanych korzyści po jej zastosowaniu *in vivo* w podłożach żelowych, zabrakło mi w dyskusji odniesienia się do kwestii omówienia doboru optymalnego składu podłoża w aspekcie właściwości samej substancji czynnej tzn. jej rozpuszczalności.

Wymienione do dyskusji kwestie w żaden sposób nie umniejszają wartości naukowej przedstawionej do oceny dysertacji, a jedynie wynikają z zainteresowania tematem i stanowią zagadnienia do rozważenia w kolejnych badaniach nad projektowaniem i oceną projektowanych półstałych formułacji.


Wnioski i konkluzja końcowa

Do najważniejszych walorów recenzowanej rozprawy zaliczam:

- istotność i aktualność wybranej tematyki, w tym wypełnienie luki poznawczej w poszukiwaniu nowych substancji do zastosowań w onkologii,
- zaproponowanie składu półstałych formułacji z trichostatyną do miejscowej aplikacji o różnym charakterze fizykochemicznym: emulsji o/w, emulsji w/o, żelu, czy formułacji stanowiącej połączenie emulsji i żelu, uzyskiwanej dzięki obecności substancji żelujących w fazie wodnej,
- selekcję formułacji z trichostatyną A do badań *in vivo* na podstawie oceny dostępności farmaceutycznej substancji,
- rekomendacje formułacji z trichostatyną A do zastosowań klinicznych po ocenie w badaniach *in vivo*.

Reasumując oceniana rozprawa doktorska mgr farm. Agnieszki Chodkowskiej stanowi oryginalne opracowanie naukowe, poruszające zagadnienie poszukiwania formułacji farmaceutycznych dla substancji o potencjalnym zastosowaniu w terapii nowotworów. Analizowane w dysertacji problemy badawcze są istotne i aktualne. Na podkreślenie zasługuje znaczenie uzyskanych wyników badań dla rozwoju prac badawczych ukierunkowanych na rozwój postaci leku do aplikacji miejscowej w terapii nowotworów, metody możliwej do zastosowania również w skojarzeniu z innymi rodzajami terapii tj. np. radioterapia i chemioterapia systemowa, co stanowi dodatkowe korzyści rozpatrywane przy opracowaniu nowych strategii walki z chorobą. W mojej opinii praca wychodzi naprzeciw stawianym oczekiwaniom, iż opracowane i wyselekcjonowane formułacje w toku prac badawczych oraz po ocenie aktywności *in vivo*, stanowią istotny wkład w rozwój nowych możliwości aplikacji substancji o potencjale przeciwnowotworowym do zastosowań klinicznych.

Przedstawiona rozprawa spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Agnieszki Chodkowskiej do dalszych etapów postępowania w celu nadania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
 KATEDRA I ZAKŁAD
 TECHNOLOGII POSTACI LEKU

 dr hab. Bożena Karolewicz