

Kraków, 4 luty 2022 r.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr farm. Katarzyny Barbary Wróblewskiej
pt. „**Charakterystyka fizykochemiczna nowej postaci oftalmicznej
salicylanu choliny**”

wykonanej w Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
pod kierunkiem i opieką naukową dr hab. Izabeli Muszalska -Kolos prof. UMP.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, zgodnie z wytycznymi przewidzianymi w art.187. ust.3. Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*, została przygotowana w formie spójnego tematycznie zbioru 5 artykułów opublikowanych, w czasopiśmie listy filadelfijskiej w latach 2015-2021, znajdujących się na liście A *Wykazu czasopism naukowych Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z 30 grudnia 2016 r.*

Wydział

Farmaceutyczny

Katedra

Technologii

Postaci Leku

i Biofarmacji

1. Wróblewska K.B., Kucińska M., Murias M., Lulek J. *Characterization of new eye drops with choline salicylate and assessment of their irritancy by in vitro short time exposure tests.*

Saudi Pharm J. (2015) 23 (4), 407-412.

Impact factor: 2,233; Punktacja MNiSW: 20,000

2. Wróblewska K.B., Plewa S., Dereziński P., Muszalska-Kolos I.

Choline salicylate analysis: chemical stability and degradation product identification

Molecules (2020) 25 (1), 51.

Impact factor: 4,411; Punktacja MNiSW: 100,000

3. Wróblewska K.B., Plewa S., Długaszewska J., Froelich A., Muszalska-Kolos I.

Design and evaluation of pharmaceutical availability, stability and quality of modified viscosity eye drops with choline salicylate

Eur. J.Pharm. Sci. (2021), 159.

Impact factor: 4,384; Punktacja MNiSW: 100,000

4. Wróblewska K.B., Malinowski B., Kucińska M., Plewa S., Długaszewska J., Muszalska-Kolos I.

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48(12) 62 05 600

fax: +48(12) 62 05 619

tpl@farmacja.cm-uj.krakow.pl



RJ

Novel Formulation of Eye Drops Containing Choline Salicylate and Hyaluronic Acid: Stability, Permeability, and Cytotoxicity Studies Using Alternative Ex
Pharmaceuticals (2021), 14, 849.

Impact factor: 5,863; Punktacja MNiSW: 100,000

5. Wróblewska K.B., Jadach B., Muszalska-Kolos I.

Progress in drug formulation design and delivery of medicinal substances used in ophthalmology

Int. J. Pharm.: (2021), 607, 121012;

Impact factor: 5,875; Punktacja MNiSW: 100,000

Punktacja:

Łączny *Impact Factor* ww. prac: **22,766**

Łączna punktacja MNiSW: **420**

Recenzowana rozprawa doktorska jest dokumentem zawierającym, oprócz kserokopii ww. publikacji, także charakterystykę przeprowadzonych badań w formie dokumentu w języku polskim uwzględniającym założenia prac doświadczalnych, omówienie wyników badań zawartych w poszczególnych publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, zestawienie piśmiennictwa, streszczenia w języku polskim i angielskim, spis skrótów, krótką charakterystykę aktywności naukowej Doktorantki. W dokumentacji zawarto również oświadczenia współautorów opublikowanych prac, z uwzględnieniem udziału w opracowaniu koncepcji badań, ich wykonaniu oraz przygotowaniu publikacji. Podkreślam również fakt, że Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich publikacji. Analiza powyższych danych wskazuje na Jej wiodącą rolę w przeprowadzanych badaniach oraz w opracowaniu publikacji. W związku z różnym miejscem zatrudnienia Promotora i Doktorantki, uważam za właściwe podanie informacji w tym zakresie na stronie tytułowej, co nie zostało uwzględnione w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Jak wspomniałam powyżej, Ustawa *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* dopuszcza przedstawienie spójnego tematycznie cyklu publikacji. Poprawność przeprowadzenia eksperymentów, uzyskanych wyników, ich interpretacji została już zweryfikowana przez niezależnych recenzentów przed dopuszczeniem artykułów do publikacji. Z tego względu moja ocena ograniczy się do analizy zawartości poszczególnych publikacji, w aspekcie ich spójności oraz oceny opisu przedmiotu badań.

W leczeniu stanów zapalnych gałki ocznej o różnej etiologii, a także leczenia bólu pooperacyjnego i stanu zapalnego po chirurgicznym usunięciu zaćmy oraz innych zabiegach chirurgicznych stosowane są niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) oraz glikokortykosteroidy. Ich

spektrum zastosowań terapeutycznych jest szerokie. Różnice we właściwościach sprawiają, że glikokortykosteroidy oprócz działania przeciwzapalnego charakteryzują się także działaniem przeciwuczuleniowym i immunosupresyjnym, natomiast NLPZ przeciwbólowym i przeciwgorączkowym. Aktualnie dostępnych jest niewiele preparatów w postaci kropli do oczu zawierających NLPZ. Są to przede wszystkim leki, w składzie których występuje indometacyna (Indocorylle), diklofenak sodu (Dicloabak, Diclofitil, Difadol, Naclof), ketorolak (Acular), flurbiprofen (Ocufen), pranoprofen (Prattack), bromfenak (Yellox), nepafenak (Nevanac). Natomiast z grupy glikokortykosteroidów stosowane są m.in. deksametazon, fluocynolon, triamcinolon, a także pochodne hydrokortyzonu i prednizolonu w formie kropli, maści do oczu oraz implantów. Wg mojej wiedzy w Niemczech zarejestrowany jest preparat zawierający 0,1% kwas salicylowy w formie kropli do oczu. W piśmiennictwie prezentowane są również wyniki badań dotyczących opracowania kropli do oczu z kwasem acetylosalicylowym. W wyniku stosowania ww. grup leków do oczu mogą występować u niektórych pacjentów działania niepożądane, np. zaburzenia funkcji nabłonka rogówki, jej stany zapalne, niespecyficzne stany zapalne spojówki lub reakcje uczuleniowe. Ich intensywność zależy m.in. od czasu trwania terapii oraz sposobu stosowania leku. Nieprzestrzeganie wskazań oraz zalecanego dawkowania leku staje się przyczyną niepowodzeń terapeutycznych.

W tym kontekście podjęta w recenzowanej rozprawie doktorskiej tematyka dotycząca opracowania i oceny jakości kropli do oczu z salicylanem choliny wpisuje się w aktualne kierunki rozwoju form leków pod kątem możliwości późniejszego wdrożenia preparatu z substancją czynną, a tym samym powiększenia asortymentu leków o właściwościach przeciwzapalnych. Pani magister Katarzyna Wróblewska podjęła się opracowania składu postaci leku do oczu z salicylanem choliny w formie kropli o zwiększonej lepkości, ze szczególnym zwróceniem uwagi na szereg aspektów kwalifikujących opracowywaną postać leku jako odpowiednią w tym celu. Analiza, na podstawie piśmiennictwa, właściwości salicylanu choliny skłoniła Doktorantkę do wyboru tej substancji jako czynnej, możliwej do zastosowania w terapii okulistycznej. Wskazywana w piśmiennictwie trwałość w roztworach wodnych, biogodność, biokompatybilność, brak działania toksycznego stanowiły mocny punkt wyjścia dla uzasadnienia celu badawczego.

W założeniach badań dotyczących opracowania kropli do oczu z salicylanem choliny uwzględniono imponujący, wieloetapowy zakres prac doświadczalnych obejmujący:

- opracowanie metody oznaczania i stabilności salicylanu choliny w różnych środowiskach,
- ocenę działania drażniącego salicylanu choliny na komórki rogówki,
- opracowanie składu kropli do oczu z salicylanem choliny o zwiększonej lepkości zawierających półsyntetyczne i syntetyczne polimery,
- ocenę jakości kropli do oczu do sporządzania których użyto kwas hialuronowy, jako przykład substancji pomocniczej pochodzenia naturalnego.

Z uwagi na to, że salicylan choliny (producent ISN Polfa Rzeszów) został zaproponowany jako nowy rodzaj substancji leczniczej przydatnej w terapii okulistycznej, za cenne należy uznać badania uzasadniające możliwość zastosowania we wskazanym celu.

W projektowaniu i późniejszym opracowaniu postaci leku istotne jest założenie zakresu badań, które posłużą do oceny finalnej formy leku. Oprócz badań związanych z jakością postaci leku na różnych etapach jej wytwarzania, ważną grupę stanowią badania o charakterze analitycznym. Spory wkład Doktorantki upatruję w rozwiązywaniu problemów oznaczania substancji czynnej i na tej podstawie określenia jej trwałości. Metody oznaczania salicylanu choliny wraz z ich walidacją oraz stabilność w opracowywanej formie były podstawowymi w aspekcie rozwoju formy leku. Ten zakres badań stanowi treść publikacji pt. *"Choline Salicylate Analysis: Chemical Stability and Degradation Product Identification"* (P2). Doktorantka dokonała analizy porównawczej dwóch metod oznaczania salicylanu choliny, tj. metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC-RP oraz metodę spektrofotometryczną, wykazując brak różnicy w precyzji oznaczeń. Oceniała obie metody jako spełniające wymagane kryteria walidacji, jednak do badań stabilności roztworów z salicylanem choliny wybrała jako bardziej selektywną metodę HPLC, ze względu na możliwość oznaczania ewentualnych produktów rozkładu oraz zanieczyszczeń. Analizowała wpływ różnego rodzaju środowisk oraz promieniowania świetlnego na stabilność substancji. Ważne, ze względu na planowanie opracowania finalnej postaci leku, było stwierdzenie termostabilności i fotolabilności salicylanu choliny, co należy uznać jako wskazówkę dla doboru właściwego opakowania.

Ocena oddziaływania salicylanu choliny na komórki rogówki gałki ocznej królika była przedmiotem istotnego, kolejnego problemu badawczego, którego wyniki zawarła Doktorantka w publikacji *„Characterization of new eye drops with choline salicylate and assessment of their irritancy by in vitro short time exposure tests”* (P1). Wykonano badania działania drażniącego salicylanu choliny w formie 1-3% roztworu wodnego izotonizowanego chlorkiem sodu oraz 2% roztworów wodnych o zwiększonej lepkości z pochodnymi celulozy, alkoholem poliwinylowym (PAV) oraz poliwinylpirolidonem. Tylko w przypadku roztworów z PVP użyto jako dodatkowe substancje pomocnicze przeciwutleniacz i EDTA. Wstępne badania obejmowały pomiar pH, ciśnienia osmotycznego oraz lepkości sporządzonych roztworów. Wyniki testu krótkotrwałej ekspozycji (STE) dla linii komórkowej nabłonka rogówki wykonanego z zastosowaniem izotonizowanych roztworów wodnych wykazały brak działania drażniącego salicylanu choliny w zakresie stosowanych stężeń. Żywotność komórek mieściła się w granicach od 90,97% do 101,7%. W przypadku roztworów salicylanu choliny o zwiększonej lepkości, wyniki testów MTT i NRU wskazywały na brak występowania działania drażniącego po 5 minutowej ekspozycji. W przypadku użycia syntetycznych polimerów zwiększających lepkość tj. PVA oraz PVP stwierdzono statystycznie istotne różnice w porównaniu do próby kontrolnej. Wartości przeżywalności komórek były wprawdzie niższe niż w przypadku pozostałych roztworów, jednak powyżej akceptowalnego zakresu, tj. $CV > 70\%$.

Wyniki powyższych badań były podstawą dla Doktorantki do zaproponowania składu opracowywanych kropli do oczu. Spośród badanych kropli o stężeniu w granicach od 1 do 3%, postanowiła dalsze prace eksperymentalne kontynuować biorąc pod uwagę 2% stężenie salicylanu choliny, zaś spośród polimerów wytypowała HPMC. Tak więc krople do oczu w formie 2% roztworu zawierającego HPMC (0,5%), chlorek sodu oraz wodorowęglan sodu były przedmiotem kolejnych badań, których wyniki zawarto w pracy pt. „*Design and evaluation of pharmaceutical availability, stability and quality of modified viscosity eye drops with choline salicylate*”(P3). Ocenę jakości kropli Doktorantka oparła o badania zawartości substancji leczniczej, badania pH, osmolarności, lepkości, jałowości, a także badania przenikania salicylanu choliny przez membrany hydrofilowe oraz przez rogówkę gałek ocznych świń *in vitro*. Jako finalne opakowanie zaproponowała minimsy. Do badań stabilności w kontrolowanych warunkach tj. temp. 25°C/60%RH oraz temp. 40°C/75% RH krople były umieszczane również w szklanych butelkach o pojemności 20 mL. Po 12 miesięcznym okresie przechowywania w komorach klimatycznych w warunkach temp. 25°C/60%RH, niezależnie od rodzaju opakowania, zmiany w wartościach stężenia salicylanu choliny, pH oraz lepkość kropli do oczu były niewielkie, co pozwala wnioskować o ich trwałości. Podobny wyniki badań uzyskano dla kropli przechowywanych w butelkach w warunkach temp. 40°C/75% RH, natomiast w minimsach już po 3 miesiącach wartości te uległy zmianie. Doktorantka tłumaczy to brakiem szczelności minimsów. Moje pytanie, już w tej chwili zadane, dotyczy wyjaśnienia, na podstawie jakiego badania brak szczelności opakowań został stwierdzony? Uwzględniając wyniki badań fotostabilności oraz zawartości zanieczyszczeń, Doktorantka wnioskuje, że preparat ten jest trwały, pod warunkiem jego przechowywania w temperaturze poniżej 25°C, bez dostępu światła.

Wymóg jałowości preparatów zarówno bezpośrednio po sporządzeniu jak i po 3 miesięcznym okresie przechowywania został również udowodniony w oparciu o metodę bezpośredniego posiewu, jak i sączków membranowych.

W badaniach przenikania substancji leczniczej przez rogówkę gałki ocznej świni określano zawartość salicylanu choliny w kompartmentcie donora komory Franza po 5 minutowej i 3 godzinnej ekspozycji oraz w samej rogówce po ekstrakcji z liofilizowanego materiału. Doktorantka podkreśla większą zawartość substancji czynnej w rogówce w przypadku użycia kropli izotonizowanych (17,1%) niż o zwiększonej lepkości (16,5%). Te, w moim odczuciu niewielkie różnice, tłumaczy spowalniającym oddziaływaniem polimeru.

Ten sam profil badań zastosowała Doktorantka do oceny sporządzonych 2% kropli do oczu z salicylanem choliny, lecz zawierających kwas hialuronowy (0,4%), wyjaławianych termicznie w temp. 105°C, 121°C, 134°C. Ocena doboru warunków wyjaławiania kropli do oczu ma podstawowe znaczenia dla określenia trwałości preparatu w badaniach rozwojowych. Jak wynika z piśmiennictwa, w przypadku użycia HA wpływ ten może się odzwierciedlać zwiększeniem produktów rozkładu, a także zmniejszeniem lepkości roztworu. Badania te były przedmiotem kolejnej publikacji pt. “*Novel Formulation of Eye Drops Containing Choline Salicylate and Hyaluronic Acid: Stability, Permeability,*

and Cytotoxicity Studies Using Alternative Ex Vivo and in Vitro Models" (P4). Metodyka badań została wzbogacona o badania interakcji między salicylanem choliny i kwasem hialuronowym, przy użyciu metody FTIR. W przypadku ww. składu recepturowego, obserwowane w trakcie badań stabilności zmiany zabarwienia roztworów, Doktorantka tłumaczy wpływem temperatury i czasu wyjąłowania. Wyniki badań cytotoksyczności oraz analiza mikroskopowa wykazały brak zmian morfologicznych komórek rogówki królika. W podsumowaniu Doktorantka stwierdza, że 2% krople z salicylanem choliny w 0,4% roztworze HA przechowywane w temp. 2-8°C przy braku dostępu światła nie wykazują oznak zmiany zabarwienia. Również wartości lepkości roztworów po 12 miesięcznym okresie przechowywania były zbliżone. Z uwagi na niewprowadzenie do składu preparatu środka konserwującego, co uznaję za słuszne założenie, Doktorantka proponuje jałowe minimsy jako finalne opakowanie opracowanych kropli do oczu.

Z dużym zainteresowaniem przeczytałam publikację przeglądową pt. „*Progress in drug formulation design and delivery of medicinal substances used in ophthalmology*”(P5). Żałuję tylko, że polski tekst w części opisowej nie prezentuje adekwatnego poziomu.

Podsumowując zawartość naukowo-badawczą ww. publikacji, stwierdzam, że Doktorantka potwierdziła znajomość zagadnień technologicznych i umiejętność interpretacji wyników badań uzyskanych w wyniku przeprowadzonych prac doświadczalnych o zróżnicowanym charakterze. Pragnę raz jeszcze podkreślić fakt wielokierunkowego ujęcia badań, wiążącego się z koniecznością pogłębienia wiedzy także w obszarze technik analitycznych, badań biologicznych oraz oceny jakości postaci leku. Interesująca tematyka badawcza, bardzo dobry warsztat badawczy, prawidłowe opracowanie metodyczne skutkuje zbiorem danych cechujących się oryginalnością naukową, czego dowodem są publikacje w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania.

Przedstawiony w publikacjach szeroki zakres badań zawdzięcza Doktorantka nie tylko swojej pracowitości, ale możliwości wykonania dużego zakresu badań w jednostkach Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu tj. w Katedrze Chemii Farmaceutycznej, w Katedrze Toksykologii oraz w swojej macierzystej jednostce tj. w Katedrze Technologii Postaci leku. Badania finansowane były częściowo w ramach projektu NCBiR (POIR.01.01.01-001004/18).

Uważam, że Doktorantka zrealizowała zaplanowane etapy badań, a wyniki zawierają elementy nowości naukowej w zakresie opracowania kropli do oczu z salicylanem choliny, substancją czynną do tej pory nie występującej w tej formie leku. Uzyskane wyniki są obiecujące, gdyż poza charakterem poznawczym mogą mieć w przyszłości znaczenie aplikacyjne.

Do najważniejszych walorów recenzowanej rozprawy doktorskiej zaliczam:

- aktualność i istotność problematyki badawczej,
- wielokierunkową ocenę właściwości salicylanu choliny w proponowanej formie leku,

- interpretację wyników kompleksowych badań nad rozwojem kropli jako postaci leku do oczu z nową substancją czynną, do tej pory nie stosowaną w terapii okulistycznej,

Po zapoznaniu się z całością dokumentacji nasuwają mi się pewne uwagi i pytania, które mogłyby być przedmiotem dyskusji podczas obrony rozprawy doktorskiej, gdyż opis części „Przedmiot badań”, „Założenia pracy”, „Omówienie publikacji” (łącznie 20 str.) nie zawiera niektórych informacji.

- Jaki był sposób przygotowania rogowki gałki ocznej do badań przenikania *in vitro*?
- Opracowanie preparatów pod kątem ich wdrożenia wymaga uzasadnienia funkcji zastosowanych substancji pomocniczych. W jakim celu zastosowano wodorowęglan sodu?
- Co było podstawą wyboru stężenia dla różnych polimerów w celu zwiększenia lepkości kropli do oczu?
- Co stanowiło kryterium wyboru 2% roztworu salicylanu choliny do dalszych badań spośród 3 opracowywanych preparatów o stężeniu 1-3%?
- W związku ze stwierdzoną fotolabilnością salicylanu choliny, w jaki sposób zabezpieczano minimsy przed oddziaływaniem promieniowania świetlnego?

Moje uwagi dotyczą niestosowania w opisie rozprawy doktorskiej terminów zgodnie z obowiązującymi w FP XII, które dla technologa winny być podstawowym punktem odniesienia np. rozpuszczalność określana jest terminem „trudno rozpuszczalna, bardzo trudno, praktycznie nierozpuszczalna” a nie np. „substancje słabo rozpuszczalne (str.9), o niskiej rozpuszczalności (str.14)”. W sytuacji, gdy substancja czynna jest przedmiotem badań pod kątem opracowania postaci leku należy stosować termin „substancja czynna” lub „lecznicza”, a nie „związek” (str. 9). W mojej opinii, tytuł rozprawy doktorskiej „Charakterystyka fizykochemiczna nowej postaci oftalmicznej z salicylanem choliny” nie oddaje jej treści, gdyż nie była to nowa forma leku, lecz od dawna stosowana. Opracowanie kropli z użyciem salicylanu choliny jako substancji czynnej przeznaczonej do zastosowania w terapii okulistycznej było nowością. Poza tym sformułowanie „w postaci oftalmicznej” budzi moje zastrzeżenie. W mojej opinii powinno być „w postaci leku do oczu”.

Chciałabym jeszcze zwrócić uwagę na niezbyt fortunate sformułowanie informacji w publikacji „*Design and evaluation of pharmaceutical availability, stability and quality of modified viscosity eye drops with choline salicylate*” (P3) dotyczącej pH kropli do oczu. Doktorantka wskazała na brak tego rodzaju informacji w Ph.Eur. 10, natomiast obecność w FPXI (odpowiednik Ph. Eur. 9,0). Zarówno w Ph. Eur. 10 jak i FP XII, będącej tłumaczeniem ww. farmakopei europejskiej nie ma określenia granicy pH dla leków do oczu. Zakres dopuszczalnego pH od 3,5 do 8,5 pojawił się w monografii narodowej „*Leki sporządzane w aptece*” w Suplemencie do FPXI i to powinno być wyraźnie zaznaczone. Ta sama monografia narodowa jest w FPXII.

Inne osiągnięcia Doktorantki

Oprócz ujętych w rozprawie doktorskiej 5 publikacji, Doktorantka ma w swoim dorobku naukowym jeszcze 2 kolejne oraz 10 streszczeń konferencyjnych krajowych i zagranicznych. Łączny współczynnik oddziaływania *IF* wynosi **22,766**, punktacja **MNiSW - 428**.

Podsumowanie

W końcowej konkluzji pragnę wyrazić przekonanie, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Wróblewskiej pt. „**Charakterystyka fizykochemiczna nowej postaci oftalmicznej salicylanu choliny**” stanowi oryginalne, bardzo wartościowe opracowanie naukowe dotyczące problematyki o charakterze technologicznym i analitycznym. Wnosi zatem element nowości i duży wkład poznawczy. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę, jak również jej zaangażowanie w rozwój innych kierunków badań w zakresie nauk farmaceutycznych, mają wysoki potencjał informacyjny i aplikacyjny. Doktorantka dzięki znacznemu poszerzeniu wiedzy teoretycznej zrealizowała założony cykl badawczy. Przeprowadziła wiele praco- i czasochłonnych badań oraz analiz.

Ustawowe wymogi *Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (tekst jedn. Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) stawiane rozprawom doktorskim zostały osiągnięte. Na tej podstawie zwracam się do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej pt. „Charakterystyka fizykochemiczna nowej postaci oftalmicznej salicylanu choliny” przygotowaną przez Panią mgr Katarzynę Barbarę Wróblewską do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Renata Jachowicz