



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr chem. lek. med. Monika Dzieciuch-Rojek

**pt. „Liposomalny układ hybrydowy do celowanej terapii
przeciwnowotworowej w raku jelita grubego”**

wykonanej w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii Wydziału Chemii, Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem Prof. dr hab. Marii Nowakowskiej oraz Katedrze Immunologii Klinicznej i Transplantologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum pod kierunkiem Prof. dr hab. Marcina Majki.

Wydział

Farmaceutyczny

Katedra

Technologii

Postaci Leku

i Biofarmacji

Tworzenie nośników substancji leczniczych, zwłaszcza pod kątem celowanego dostarczenia do określonego miejsca w organizmie tj. narządów, tkanek, komórek to jeden z zasadniczych kierunków badań współczesnej nanotechnologii farmaceutycznej. Spośród nanostrukturalnych nośników, liposomy są definiowane jako układy do terapii celowanej. Ze względu na rozmiary, podawane są drogą pozajelitową. Warunkiem skuteczności terapeutycznej jest dłuższy czas przebywania we krwi, co uzyskiwane jest m.in. poprzez tworzenie liposomów z otoczką hydrofilową. Efektem 60 lat badań nad sporządzaniem stabilnych liposomów jest opracowanie kilkunastu preparatów. Z uwagi na możliwość uwalniania substancji leczniczej bezpośrednio w tkance docelowej, liposomy są wciąż przedmiotem szczególnego zainteresowania badawczego, zwłaszcza w zakresie terapii przeciwnowotworowej.

Realizacja zadań badawczych określonych w rozprawie doktorskiej powiodła się, dzięki możliwościom warsztatowym, jakie miała Doktorantka pracując w zespołach interdyscyplinarnych. Nie często zdarza się, by zakres prac badawczych obejmował tak różnorodną metodycznie tematykę. Podjęcie rozwiązania tego złożonego zagadnienia znalazło uzasadnienie w sprawowaniu opieki naukowej nad przebiegiem prac i ich ukierunkowaniem przez dwóch promotorów w osobach: Prof. dr hab. Marii Nowakowskiej i Prof. dr hab. Marcina Majki, autorytetów naukowych w reprezentowanych dyscyplinach oraz umiejętnościom Doktorantki, będącej absolwentką dwóch kierunków studiów tj. chemii i medycyny.

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48(12) 62 05 600

fax: +48(12) 62 05 619

W ocenianej pracy można wyróżnić dwa wątki badawcze tj.

- opracowanie hybrydowego układu nośnikowego zawierającego 2 substancje czynne: 5-fluorouracyl o działaniu cytotoksycznym oraz itrakonazol o działaniu przeciwgrzybiczym, z uwzględnieniem pełnej jego charakterystyki;
- ocena właściwości opracowanego układu nośnikowego w oparciu o badania biologiczne *in vitro* i *in vivo*.

Poszczególne ich etapy Doktorantka rozwijała w ramach Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich „Nauki molekularne dla medycyny” MOL-MED. (projekt nr POKL.04.01.01-000056/10), projektu Doctus (projekt nr ZS.4112-198/12), projektu Opus IV NCN (2012/07/B/ST5/00913) pod kierownictwem dr hab. Mariusza Kępczyńskiego.

Przytoczone powyżej ogólne argumenty potwierdzają słuszność wielokierunkowego podejścia do jasno określonego celu pracy, by rozwiązanie problemów badawczych na poszczególnych etapach przysłużyło się optymalizacji formy liposomalnej leku i dało podstawę do realizacji dalszych badań, a w konsekwencji uruchomienia ścieżki wdrozeniowej.

- Ogólna charakterystyka edytorska rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska mgr Moniki Dzieciuch-Rojek zredagowana w formie 168 stron ma ogólnie przyjęty układ tj. wprowadzenie i cel pracy, część teoretyczną, część doświadczalną uwzględniającą omówienie metodyki badań w oparciu o nowoczesne zaplecze aparaturowe oraz omówienie wyników badań w ramach poszczególnych faz eksperymentów. Uzyskane rezultaty znajdują syntetyczne odbicie w części podsumowanie i wnioski. Rozdział „Bibliografia“ jest bardzo obszernym dokumentem z 292 pozycjami piśmiennictwa, które znajdują uzasadnienie w treści rozprawy doktorskiej. Zarówno część teoretyczna jak i doświadczalna dokumentowana jest także odpowiednio 3 i 15 tabelami oraz 14 i 49 rysunkami. Dołączony wykaz dorobku naukowego dokumentuje udział Doktorantki jako współautorki 3 prac opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz 14 prezentacji posterowych podczas konferencji krajowych i zagranicznych.

- Tematyka rozprawy doktorskiej.

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy opracowania liposomalnego nośnika z cytotoksyczną substancją czynną tj. 5-fluorouracylem przeznaczonego do terapii celowanej w formie preparatu aplikowanego drogą pozajelitową. Jasno sformułowany cel pracy umożliwia śledzenie sposobu jego realizacji w części doświadczalnej.

W obejmującej 57 stron części wstępnej rozprawy Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący charakterystyki biologii i epidemiologii nowotworów złośliwych oraz współczesnych metod terapeutycznych. W sposób przejrzysty zostały omówione wielokompartментowe systemy nośnikowe. Zebrany materiał informacyjny na temat wyników prac doświadczalnych dotyczących układów liposomalnych z 5-fluorouracylem uzyskanych w innych ośrodkach badawczych jest niezwykle istotny ze względu na ukierunkowanie przez Doktorantkę prac eksperymentalnych.

Sposób opracowania tej części pracy, a zwłaszcza selekcja informacji w oparciu o 292 pozycje piśmiennictwa zasługuje na duże uznanie. Przegląd wiedzy w omawianym zakresie, logiczny i usystematyzowany sposób naświetlania zagadnień w kontekście własnego celu badawczego, świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do podjęcia tak szerokiej problematyki naukowej.

Część doświadczalna obejmuje kilka obszarów badawczych:

- formulacyjny w zakresie syntezy organicznej oraz tworzenia modyfikowanych struktur liposomalnych,
- analityczny w zakresie charakterystyki i oceny poszczególnych układów, w oparciu o nowoczesne fizykochemiczne techniki badawcze,
- biologiczny z uwzględnieniem aspektów biofarmaceutycznych.

Spory wkład Doktorantki upatruję w rozwiązaniu problemów istotnych z punktu widzenia formulacyjnego. Niezwykle interesujący jest szlak doświadczalny, począwszy od próby trój etapowej syntezy folianowego liganda otrzymanego w wyniku przyłączenia do zmodyfikowanej kwasem foliowym aminy poliglikolu etylenowego z DSPE. Ze względu na brak pozytywnych wyników oczyszczania związku, podstawą dalszego projektowania był komercyjnie dostępny ligand FA-PEG-DSPE.

Do tworzenia liposomów użyto trzy rodzaje lipidów: EYPC, POPC, DPPC. Metoda sporządzania polegała na tworzeniu filmu lipidowego, jego hydratację buforem fosforanowym i sonikację. W wyniku tego procesu uzyskano małe liposomy jednowarstwowe (SUV). Podkreślenia wymaga idea tworzenia filmu lipidowego wzbogaconego o itrakonazol jako substancję czynną o właściwościach modulatora białka oporności wielolekowej komórek nowotworowych. Zakres tych badań, prowadzony przez Doktorantkę z niezwykłą starannością, wyjaśnił szereg aspektów istotnych dla tworzenia liposomów w sposób powtarzalny. Z punktu widzenia technologii farmaceutycznej za szczególnie istotne uznaje badanie rozmiaru i stabilność liposomów modyfikowanych itrakonazolem oraz podziału itrakonazolu między fazę wodną i lipidową dla liposomów konwencjonalnych i modyfikowanych glikolem polioksyetylenowym.

Wizualizacja w transmisyjnym mikroskopie elektronowym wykazała różnice w dyspersji liposomów na korzyść pegylowanych. Należy podkreślić, że wprowadzenie itrakonazolu do błony lipidowej w ilości nie przekraczającej 15 mol% nie zakłóca tworzenia się form liposomalnych. W badaniach topografii filmów lipidowych nie wykazano destabilizacji błon lipidowych, a niska wartość parametru szorstkości świadczy o gładkiej ich powierzchni. Dane dotyczące zmian położenia i konformacji cząsteczek itrakonazolu w błonie uzyskano poprzez symulację metodą dynamiki molekularnej. W ten sposób stwierdzono możliwość lokalizacji cząsteczek itrakonazolu w regionie grup polarnych i glicerolu oraz pomiędzy łańcuchami polimerów warstwy zewnętrznej.

Substancję czynną tj. 5-fluorouracyl wprowadzono do 4 rodzajów liposomów: konwencjonalnych (PL), modyfikowanych itrakonazolem (PLA), ukierunkowanych kwasem foliowym (FPL) oraz zawierających oprócz kwasu foliowego również itrakonazol (15 mol%) (FPL1). Największą efektywnością zamykania substancji czynnej w ilości $55,93 \pm 8,85\%$ charakteryzował się czwarty z wymienionych rodzajów liposomów, a więc ukierunkowany FA i zmodyfikowany dodatkiem itrakonazolu. Uzyskano w niewielkim stopniu zróżnicowany profil uwalniania substancji czynnej dla trzech rodzajów liposomów. Większe zahamowanie uwalniania dotyczy układu FPL. W porównaniu z krzywą szybkości rozpuszczania 5-fluorouracylu, uwalnianie substancji czynnej z liposomów jest zmniejszone do wartości od ok. 57% do ok. 70 % po 25 godzinach. Przebieg krzywych ma charakter dwufazowy, gdyż ilość uwolnionej substancji leczniczej po 4 godzinach mieściła się w granicach od ok. 55% do 65%. Po tym czasie substancja lecznicza uwalnia się w niewielkim stopniu lub pozostaje na niezmiennym poziomie. Tego rodzaju profil uwalniania substancji czynnej nie jest jeszcze

optymalnym. Znaczna ilość uwolnionej substancji praktycznie po 1-2 godzinach, a potem zahamowanie dalszego procesu uwalniania może skutkować m.in. brakiem trwałości preparatu liposomalnego.

Badania oddziaływania sporządzonych układów z linią komórkową raka jelita grubego potwierdziły trafność założeń opracowania liposomów ukierunkowanych kwasem foliowym i zmodyfikowanych itrakonazolem.

Na przykładzie liposomów niemodyfikowanych, pegylowanych modyfikowanych itrakonazolem i/lub ukierunkowanych wykazano w badaniach cytotoksyczności największy efekt toksyczny 5-fluorouracylu w wyniku zamknięcia w liposomach ukierunkowanych kwasem foliowym (FPL, FPLI), zaś poprzez modyfikację itrakonazolem sumaryczne korzystne oddziaływanie na skuteczność przeciwnowotworową. Liposomy te są wychwytywane przez komórki Caco-2 przy udziale receptora dla kwasu foliowego. Wydajność wiązania liposomów ukierunkowanych z FR α jest większa niż wolnego kwasu foliowego.

Do badan *in vivo* na myszach wybrano liposomy pegylowane (7 mol% PEG-DSPE) ukierunkowane kwasem foliowym (0,5 mol% FA-PEG-DSPE) i modyfikowane itrakonazolem (15 mol%) zawierające 5-fluorouracyl. Analizie poddano próbki surowicy, moczu, wyizolowane guzy oraz narządy. Maksymalną intensywność fluorescencji w podskórnych guzach identyfikowano po 10 min. od podania preparatu. Układ liposomalny utrzymywał się w guzie przez 6 godzin. Rejestracja prowadzona do 24 godz. wykazała stopniowe osłabienie sygnału fluorescencyjnego do granicy jego wykrywalności. Te samą zależność identyfikowano w wyizolowanych narządach tj. w nerkach i wątrobie. Podkreślenia wymaga prawidłowe zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentów w ramach etapu biologicznego badań, których pozytywne wyniki niewątpliwie stymulują do rozwijania dalszego etapu prac o charakterze badawczo-rozwojowych.

Pragnę podkreślić, że przeprowadzona przez Doktorantkę kompleksowa ocena utworzonego układu hybrydowego, który może posłużyć jako model nośnikowy do dalszych etapów badań biologicznych i formulacyjnych budzi moje duże uznanie.

- Oryginalność dorobku naukowego w ramach rozprawy doktorskiej

Szeroka tematyka badawcza, doskonały warsztat badawczy, logiczne planowanie dalszych etapów badań w oparciu o uzyskane wyniki, bardzo dobre opracowanie metodyczne

skutkuje niezwykle cennym zbiorem danych i wniosków, cechujących się oryginalnością naukową.

Jako szczególnie ważne osiągnięcia uznają:

- opracowanie ukierunkowanego kwasem foliowym liposomalnego nośnika 5-fluorouracylu, którego błona lipidowa została zmodyfikowana drugą substancją czynną – itrakonazolem o właściwościach przeciwgrzybiczych,
- określenie czynników warunkujących tworzenie zmodyfikowanych liposomów,
- udowodnienie dotarcia 5-fluorouracylu w formie ukierunkowanego systemu nośnikowego drogą naczyń krwionośnych do guza nowotworowego oraz jego metabolizowanie w wątrobie i nerkach, co kwalifikuje testowany układ do tzw. celowanej terapii.

Prezentowane w rozprawie doktorskiej wyniki badań są źródłem niezwykle istotnych informacji z punktu widzenia technologii farmaceutycznej. Szczegółowa dokumentacja wyników badań stanowi nie tylko uzasadnienie wielokierunkowych prac doświadczalnych, ale również podstawę dalszych działań w aspekcie formulacyjnym o charakterze aplikacyjnym. Już na tym etapie wyniki badań Doktorantki stanowią o sukcesie naukowym. Uzyskanie w dalszych badaniach stabilności liposomalnego nośnika jako wielokompartimentowej postaci leku świadczyłoby o oryginalności zaprojektowanego układu hybrydowego i niezwyklej wartości terapeutycznej.

W tekście rozprawy doktorskiej znajdują jedynie drobne błędy literowe, co w kontekście jej obszerności nie umniejsza mojej bardzo dobrej oceny redakcyjnej. Słownik skrótów uwzględnia kilka form opisowych dla poszczególnych symboli. Zamienne ich stosowanie jest prawidłowe, jednakże precyzowanie do kolejnych badań jednej formy byłoby bardziej czytelne.

Badania uwalniania substancji leczniczej z liposomów prowadzono metodą dializacyjną. Przebieg profili uwalniania substancji czynnej z liposomów konwencjonalnych i modyfikowanych itrakonazolem jest bardzo zbliżony, nieco szybciej proces ten zachodzi z docelowej formuacji tj. liposomów ukierunkowanych FA i zmodyfikowanych itrakonazolem, jakkolwiek różnice w wartościach odczytywanych z wykresu są niewielkie. Szkoda, że skala w przedziale czasowym 0-2 h nie została rozszerzona. Wówczas interpretacja wyników byłaby znacznie ułatwiona. Próby dopasowania kinetyki uwalniania substancji czynnej do różnych modeli matematycznych wskazują najlepszą korelację dla modelu Higuchiego, a więc mechanizm dyfuzji cząsteczek substancji czynnej z opracowanej formuacji. Jednakże

zoptymalizowania wymagałaby szybkość uwalniania w początkowej fazie oraz zwiększenie ilości uwolnionej substancji w fazie drugiej. Uwagi te dotyczą dalszej optymalizacji formulacji, lecz w żaden sposób nie wpływają na pozytywną ocenę uzyskanych wyników badań.

Uznaję, za przejęzyczenie sformułowanie na str. 115 l. 8 „Po 4 h obserwacji 69% 5-FU wyciekło z nośnika”, gdyż jak sądzę jest to obliczana ilość uwolnionej substancji czynnej. Termin „wyciek substancji” jest określeniem pozwalającym ocenić stabilność lub jej brak w odniesieniu do układu liposomalnego. Również nieprecyzyjne jest określenie „wyływ leku z nośnika” (str. 60) lub „uwalnianie terapeutyku” (str. 115).

Poczynione nieliczne jak widać uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości rozprawy doktorskiej. Ten niezwykle obszerny materiał eksperymentalny wymagał ze strony Doktorantki dobrego wszechstronnego przygotowania. Godnym więc podkreślenia jest wkład pracy związany z dużą ilością badań zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Dokonanie właściwej selekcji wyników z uwzględnieniem przekrojowej prezentacji niektórych danych świadczy o umiejętności Doktorantki właściwej oceny zagadnień w całym zakresie prac doświadczalnych.

W podsumowaniu przedstawionej recenzji pragnę pokreślić moją bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej mgr Moniki Dzieciuch-Rojek, ze względu na kompleksowe rozwiązanie problemu naukowego. Realizacja założeń badawczych powiodła się dzięki dobremu przygotowaniu teoretycznemu Doktorantki, jej umiejętnościom praktycznym i dojrzałości w prowadzeniu prac doświadczalnych.

W mojej opinii rozprawa doktorska mgr chem. lek. med. Moniki Dzieciuch-Rojek spełnia wymogi *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami)* i na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o przyjęcie i dopuszczenie mgr chem. lek. med. Moniki Dzieciuch-Rojek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 24.11.2015 r.

Kierownik
Katedry i Zakładu Technologii
Postaci Leku i Biofarmacji CM UJ
Renata Jachowicz
Prof. dr hab. Renata Jachowicz