

Prof. dr hab. Władysław Lasoń  
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk  
ul. Smętna 12  
31-343 Kraków

### Recenzja

#### **rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Milewskiej pt. "Doświadczalne oraz farmakoekonomiczne aspekty polimerowych nośników leków".**

Przedłożoną do oceny rozprawę doktorską wykonano w Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem dr hab. n. med. Katarzyny Niemirowicz-Laskowskiej. Syntezę i analizę fizykochemiczną nośników leków przeprowadzono w ramach współpracy w Zakładzie Polimerów i Syntezy Organicznej Uniwersytetu w Białymstoku pod opieką promotora pomocniczego dr n. chem. Iwony Misztalewskiej-Turkowicz. Badania zostały sfinansowane z funduszy Narodowego Centrum Nauki - grant NCN/2016/21/B/ST5/01365 (AZW).

Rozprawa liczy 128 stron i jej konstrukcja oparta jest na dwóch obszernych, spójnych tematycznie artykułach naukowych (pracy przeglądowej i oryginalnej) opublikowanych w latach 1921 i 1923 w międzynarodowych czasopismach o wysokim łącznym współczynniku oddziaływania (*impact factor*), wynoszącym 13,241 i przyznanych 280 punktach Ministerstwa Edukacji i Nauki. Wchodzące w skład dyzertacji artykuły poprzedzone są obszernym wprowadzeniem zawierającym wykaz stosowanych skrótów, uzasadnienie wyboru tematyki, celów i zastosowanych metod,. Ponadto ta część rozprawy obejmuje zwięzły opis wyników oraz najważniejsze wnioski z przeprowadzonych badań. Wprowadzenie jest obszerne, obejmuje ponad 30 stron tekstu w języku polskim i 76 pozycji adekwatnie wybranych pozycji piśmiennictwa w porządku alfabetycznym. Pierwszy rozdział rozprawy jednoznacznie wskazuje na ważkość podjętej przez doktorantkę problematyki badawczej. Próby zastosowania nanotechnologii w diagnostyce i terapii chorób nowotworowych są niewątpliwie aktualnym i dynamicznie rozwijającym się nurtem badawczym współczesnej medycyny. Zatem wybór tematu rozprawy doktorskiej można uznać za dobrze przemyślany i trafny, ale stanowiący też spore wyzwanie dla kandydatki do stopnia doktora. Jest to bowiem wciąż pionierski, wymagający dostępu do nowoczesnej aparatury, gruntownego przygotowania teoretycznego i umiejętności interdyscyplinarnej współpracy obszar badań. Doktorantkę szczególnie zainteresowała możliwość opracowania sfunkcjonalizowanych polimerowych nanoprzenośników dla klasycznego leku przeciwnowotworowego - 5-fluorouracylu - dla zwiększenia jego efektywności w zwalczaniu raka jelita grubego. Autorka rozprawy przekonująco argumentuje, że ten typ nowotworu, ze względu na jego częste występowanie, lekooporność i powodowanie wysokiej śmiertelności wśród pacjentów wymaga zdecydowanie skuteczniejszych niż obecne metod leczenia. Kompetentnie, a zarazem przystępnie, doktorantka

opisuje główne mechanizmy lekooporności komórek nowotworowych i teoretyczne podstawy terapii celowanej w oparciu o inteligentne nanotransportery leków. Powyższa strategia badawcza stwarza uzasadnioną nadzieję na uzyskanie innowacyjnych form leków wykazujących zwiększoną skuteczność i bezpieczeństwo chemioterapii. Pierwszym celem rozprawy było dokonanie przeglądu literatury dotyczącej możliwości nanomedycyny w leczeniu nowotworów, zwłaszcza raka jelita grubego, z uwzględnieniem aspektów ściśle medycznych jak i farmakoekonomicznych. Realizacja tego celu została udokumentowana w formie pracy przeglądowej nr 1 (Milewska i wsp., *Current Trends and Challenges in Pharmaco-economic Aspects of Nanocarriers as Delivery Systems for Cancer Treatment. International Journal of Nanomedicine*, 2021: 16, s. 6593 – 6644). Publikacja składa się z trzech części. Część pierwsza jest wprowadzeniem do farmakoekonomiki jako interdyscyplinarnej dziedziny wiedzy łączącej nauki medyczne i ekonomiczne. Autorzy publikacji podkreślają, że farmakoekonomika umożliwi dokonanie obiektywnej oceny opłacalności stosowanych leków i określa zależność pomiędzy kosztem farmakoterapii a osiągniętym efektem zdrowotnym. W drugiej części artykułu przedstawiono korzystne działanie nanoprzenośników leków w badaniach przedklinicznych i klinicznych, klarownie omówiono problem i mechanizmy oporności na chemioterapeutyki, a także możliwości przeciwdziałania temu niekorzystnemu zjawisku. Trzeci rozdział przeznaczono na omówienie postępów w projektowaniu i syntezie nanoprzenośników leków. Końcowy rozdział podsumowuje aktualne dane na temat farmakokinetycznych i toksycznych właściwości nanopreparatów. Akcent położony jest na zastosowanie nanopreparatów w leczeniu chorób nowotworowych, ale uwzględniono też inne poważne schorzenia takie jak cukrzyca, choroby sercowo-naczyniowe, choroby neurodegeneracyjne, zwyrodnieniowe i zakaźne. Obiektywnie oceniono zarówno możliwości translacyjne jak i ograniczenia nanomedycyny na obecnym etapie jej rozwoju. Niewątpliwie słuszny jest wniosek doktorantki, że osiągnięcia nanomedycyny otwierają szerokie możliwości rozwoju spersonalizowanej terapii, co powinno przełożyć się zarówno na większą skuteczność jak i na obniżenie kosztów bezpośrednich i pośrednich procesu leczenia. Drugim, i w mojej opinii zasadniczym celem rozprawy doktorskiej, było opracowanie termowrażliwych nanocząstek polimerowych sfunkcjonalizowanych kwasem foliowym jako nośników 5-fluorouracylu i ocena ich efektywności w hamowaniu proliferacji oraz nasilaniu apoptozy i nekrozy komórek raka jelita grubego w adekwatnych modelach *in vitro*. Co ważne, zaplanowano także ocenę biokompatybilności uzyskanych nanopreparatów. Realizacja tak wytyczonych celów wymagała współpracy z zespołem chemików, którzy syntetyzowali kopolimery, modyfikowali je kwasem foliowym i enkapsulowali nimi 5-fluorouracyl. Jak pisze doktorantka nośniki zostały dokładnie scharakteryzowane pod kątem własności fizyko-chemicznych przy użyciu metod chromatograficznych, technik spektralnych i transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Do oceny właściwości biologicznych otrzymanych nanopreparatów w aspekcie ich biokompatybilności użyto prawidłowych komórek krwi ludzkiej oraz linii komórkowej fibroblastów i kardiomiocytów. Działanie przeciwnowotworowe analizowano na trzech liniach raka jelita grubego różniących się profilem molekularnym i wrażliwością na 5-fluorouracyl. Starannie zaplanowane badania, bogata i różnorodna metodyka były gwarantem uzyskania wartościowych rezultatów, które zostały opublikowane w oryginalnej pracy nr 2 (Milewska i wsp., *Folic acid-conjugated thermoresponsive polymeric particles for targeted delivery of 5-fluorouracil to CRC cells. International Journal of Molecular Sciences*, 2023: 24(2), 1364, s. 1 - 25.) Artykuł zawiera dokładny opis procesu otrzymania nanoformulacji i ich fizykochemiczną charakterystykę (wymiary nanocząstek, potencjał zeta itp.). Sporo miejsca poświęca doktorantka opisowi właściwości biologicznych otrzymanych nanopreparatów. W tym zakresie mgr Sylwia Milewska uzyskała szereg interesujących i oryginalnych wyników, które

decydująco wpływają na wysoką ocenę rozprawy doktorskiej. Wykazała że nanonośniki są biokompatybilne z prawidłowymi komórkami krwi i co ważne, zmniejszają cytotoksyczne działanie 5-fluorouracylu na te komórki. Nośniki kopolimerowe z enkapsulowanym antymetabolitem wykazały słabszy wpływ cytotoksyczny na kardiomiocyty niż 5-fluorouracyl w postaci wolnej. Powyższe rezultaty dowodzą, że zsyntetyzowane w ramach rozprawy nanonośniki obniżają zarówno toksyczność hematologiczną jak i kardiotoxyczność 5-fluorouracylu. Kolejnym istotnym wynikiem było wykazanie, że enkapsulowany 5-fluorouracyl w mniejszym stopniu zmniejszał żywotność fibroblastów skóry i okrężnicy niż w stanie wolnym, co także może obniżyć działania niepożądane leku. Pozytywne wyniki uzyskano również testując cytotoksyczny wpływ nanopreparatu na trzy linie komórkowe raka jelita grubego o różnej lekooporności. Stwierdzono, że 5-fluorouracyl w sfunkcjonalizowanym kwasem foliowym polimerowym nanonośniku wykazał silniejsze działanie cytotoksyczne na te komórki niż w stanie wolnym. Ponadto, nanopreparat wywierał też silniejsze działanie hamujące na aktywność metaboliczną i proliferację komórek nowotworowych. Co więcej, polimerowe nanonośniki z enkapsulowanym 5-fluorouracylem skuteczniej indukowały apoptozę i nekrozę komórek nowotworowych niż lek w stanie wolnym. Powyższe, niezwykle zachęcające wyniki testów na hodowlach komórkowych, muszą być jednak zweryfikowane w przyszłości w odpowiednich modelach in vivo. Jak wskazują badania innych autorów, poważnym wyzwaniem dla projektujących nanoleki jest zapewnienie ich stabilności w płynach ustrojowych, ochrona przed układem siateczkowo-śródbłonkowym (fagocytarnym) śledziony i wątroby oraz zwiększenie przenikalności przez bariery biologiczne. Często czas przebywania takich nanopreparatów we krwi krążącej jest zbyt krótki dla uzyskania korzystnych efektów klinicznych. Te i inne problemy sprawiają, że chociaż wiele nanopreparatów jest obecnie testowanych w badaniach przedklinicznych i pierwszych fazach prób klinicznych, to tylko nieliczne z nich zostały zarejestrowane jako leki. Po opisie wyników ( str. 14 – 21) zabrakłomięjsca na krótką dyskusję, w której doktorantka mogłaby odnieść się do tej kwestii. Przydatna byłaby też zwięzła, porównawcza charakterystyka opracowanych w ramach rozprawy doktorskiej kopolimerowych nośników leku z nanonośnikami o innej budowie fizykochemicznej np. inne polimery, liposomy, dendrymery itp., tak aby można było lepiej uwydatnić innowacyjność własnych nanopreparatów. Wnioski sformułowano logicznie i zgodnie z uzyskanymi wynikami w 7 punktach. Wymieniono najważniejsze zalety zsyntetyzowanych nanopreparatów podkreślając ich zdolność do nasilenia przeciwnowotworowego działania 5-fluorouracylu przy jednoczesnym zmniejszeniu działań niepożądanych tego antymetabolitu. Mam kilka uwag redakcyjnych dotyczących rozprawy. Tytuł rozprawy wydaje się nieco zbyt ogólny. Praca dotyczy przede wszystkim oceny przydatności nanoprzenośników w chemoterapii raka jelita grubego, a nie różnych rodzajów nowotworów, co powinien odzwierciedlać tytuł rozprawy. Ogólnie praca napisana jest poprawnym językiem, jednak doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów literowych, skrótów myślowych, czy niezręcznych sformułowań np.

str. 12, Addition-Fragemnation

str. 16, z ekapsulowanym

str. 16, ... leczenie komórek fibroblastów skóry za pomocą 5-FU, Natomiast w przypadku traktowania fibroblastów okrężnicy zaobserwowano...

str. 17, W oparciu o antymetabolity, sposób działania indukuje cytotoksyczność...

str. 59 – 71 Dane zawarte w tabelach na tych stronach są opisane bardzo drobną czcionką i dlatego są trudno czytelne. Moim zdaniem, lepiej byłoby przedstawić te tabele w układzie poziomym.

Powyższe drobne niedociągnięcia redakcyjne nie obniżają wysokiej wartości merytorycznej niniejszej dyzertacji.

Rozprawa zawiera oświadczenia wszystkich współautorów załączonych publikacji, które wskazują, że rola mgr Sylwii Milewskiej w generowaniu tych artykułów była pierwszoplanowa. Zgodnie z oświadczeniem doktorantki na str. 114, jej udział w przygotowaniu pracy przeglądowej (praca nr 1) oceniony na 75% polegał na współtworzeniu koncepcji i planu pracy, zebraniu i analizie literatury oraz redakcji manuskryptu. W pracy oryginalnej (praca nr 2) w dużej mierze o profilu fizykochemicznym, doktorantka oceniła swój udział na 60% i polegał on na współtworzeniu koncepcji prac, hipotez badawczych, przeprowadzeniu badań biologicznych, analizie wyników i pracach edytorskich.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Sylwii Milewskiej pt. "Doświadczalne oraz farmakoekonomiczne aspekty polimerowych nośników leków" oceniam bardzo wysoko. Praca dotyczy niezwykle istotnego i aktualnego problemu współczesnej medycyny jakim jest zastosowanie nanotechnologii w leczeniu onkologicznym. Wyniki uzyskane w ramach rozprawy są merytorycznie wysoce wartościowe i posiadają wyraźne walory aplikacyjne. Należy podkreślić, iż doktorantka realizowała wyjątkowo trudny i ambitny kierunek badawczy, wymagający szerokiej wiedzy teoretycznej, opanowania nowoczesnych technik analitycznych, a także umiejętności współpracy z ekspertami różnych dyscyplin naukowych. Z satysfakcją stwierdzam, iż Mgr Sylwia Milewska sprostała wszystkim powyższym wymogom, a ponadto wykazała duże zdolności do samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Oświadczam, że rozprawa spełnia kryteria stawiane dysertacjom naukowym przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Wnioskuje o dopuszczenie przez Radę Naukową Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku mgr Sylwię Milewską do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na innowacyjną problematykę rozprawy, wartość merytoryczną i potencjalnie aplikacyjną uzyskanych wyników, potwierdzoną publikacjami w recenzowanych i o wysokich współczynnikach oddziaływania czasopismach medycznych, zgłaszam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o jej wyróżnienie.

Kraków, 22, 11, 2023 r.

Prof. dr hab. Władysław Lason