

Białystok, 07. 12. 2023 r.

dr hab. Adam Tylicki
Wydział Biologii, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii
Uniwersytet w Białymstoku
ul. Ciołkowskiego 1J
15-245 Białystok

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Milewskiej pt. „Doświadczalne
oraz farmakoekonomiczne aspekty polimerowych nośników leków”**

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Niemirowicz-Laskowskiej
i dr Iwony Misztalewskiej-Turkowicz

W medycynie XXI wieku silnie odciska się trend terapii celowanej. W obrębie tego trendu dynamiczny rozwój przeżywa strategia systemów dostarczania leków, które poprzez odpowiednio zaprojektowaną strukturę chemiczną uwalniają substancję czynną dokładnie w miejscu przeznaczenia. Terapie takie mogą przynosić pozytywne efekty farmakoekonomiczne przyczyniając się do ograniczenia całkowitych kosztów leczenia pacjentów. W ten właśnie, niezmiernie aktualny, kierunek rozwoju medycyny i biochemii wpisuje się przedłożona mi do oceny praca doktorska.

Praca powstała w wyniku współdziałania 3 ośrodków akademickich: Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (którego przedstawicielkami są Doktorantka i Promotorka rozprawy), Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej UMB, jak też Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku (którego przedstawicielką jest Promotorka pomocnicza rozprawy). Praca doktorska składa się z dwóch opublikowanych artykułów wieloautorskich (Milewska i in. 2021, *International Journal of Nanomedicine* 16: 6593-6644 – dalej określane jako praca 1 i Milewska i in. 2023, *Journal of Molecular Sciences* 24(2): 1364 – dalej określane jako praca 2). Uzupełnieniem rozprawy jest szeroki komentarz w języku polskim zawierający streszczenie pracy, wsparty aktualną literaturą fachową i oświadczeniami wszystkich współautorów dotyczącymi ich udziału w badaniach. Pierwsza pozycja mgr Sylwii Milewskiej wśród autorów obu prac wskazuje na Jej wiodący wkład w ich powstanie. Fakt ten znajduje również odzwierciedlenie w oświadczeniach współautorów, z których wynika, że Autorka rozprawy przyczyniła się w

75% do powstania pracy 1 i w 60% do powstania pracy 2. Obie prace ukazały się w anglojęzycznych periodykach fachowych o zasięgu światowym i były efektem realizacji projektów finansowanych przez NCN.

Po lekturze obu prac, składających się na rozprawę doktorską mgr Sylwii Milewskiej, odnoszę wrażenie, że tytuł rozprawy jest zbyt ogólny i biorąc pod uwagę treść artykułów można by go bardziej doprecyzować. Autorka powinna też zwracać większą uwagę na dobór słów kluczowych przy edycji swoich tekstów. Uważam, że powtarzanie w słowach kluczowych zwrotów zawartych w tytule pracy jest niewłaściwe, gdyż słowa kluczowe powinny rozszerzyć czytelnikowi zakres treści artykułu po zapoznaniu się z jego tytułem.

Nowe strategie leczenia nowotworów skupiają się w trzech zasadniczych aspektach. Po pierwsze, mobilizacja własnych komórek odpornościowych do walki z nowotworem (przykładowo terapia CAR-T). Po drugie, wykorzystanie natywnych mechanizmów komórkowych do naprawy wadliwego wzoru ekspresji genów (przykładowo zastosowanie odpowiednich miRNA i anty miRNA). Po trzecie, rozwój terapii celowanych, gdzie stosowane dotąd ogólnoustrojowo leki są kierowane za pomocą odpowiednich nośników do komórek nowotworowych. Rozprawa doktorska mgr Sylwii Milewskiej dotyczy konkretnie tego ostatniego aspektu. Należy tu przyznać rację Autorce, że właśnie ta droga kuracji może być obecnie najkorzystniejsza pod względem farmakoekonomicznym. Eliminuje ona część kosztów badań podstawowych, przedklinicznych i klinicznych nowych związków czynnych skupiając się na ukierunkowaniu transportu znanych leków. Wpływa to z kolei na ograniczenie dawki, czasu terapii i kosztów niwelowania niepożądanych skutków ubocznych chemioterapii ogólnoustrojowej, do czego Autorka szeroko nawiązuje w pracy 1. Tu nasuwa się również pytanie: czy w długofalowej perspektywie skutki farmakoekonomiczne dwóch pierwszych wyżej wymienionych aspektów mogą zostać znacznie ograniczone i okazać się korzystniejsze niż skutki chemioterapii celowanej? Niemniej jednak dane przywołane w pracy 1 znakomicie uzasadniają, pod względem farmakoekonomicznym, podjęcie przez Doktorantkę badań eksperymentalnych nad nośnikami 5-fluorouracylu do terapii celowanej raka jelita grubego. Trzeba również stwierdzić, że wspomniana praca przeglądowa bardzo szeroko zarysowuje temat farmakoekonomicznych aspektów wykorzystania różnych nano-nośników i różnych leków nie tylko w terapii nowotworów, przez co stanowi dobry wstęp, a zarazem uzasadnienie podjętych badań eksperymentalnych.

Oryginalnym elementem naukowym ocenianej rozprawy jest niewątpliwie uzyskanie i biologiczna charakterystyka oddziaływania na komórki w układach *in vitro* termowrażliwych

nanoukładów polimerowych funkcjonalizowanych kwasem foliowym, zdolnych do przenoszenia i uwalniania 5-fluorouracylu. Uzyskane nanocząstki polimerowe nie były wcześniej opisane w literaturze przedmiotu, a ich wyczerpująca fizykochemiczna charakterystyka zaprezentowana w pracy 2 świadczy o oryginalności metody i potencjalnej użyteczności uzyskanych nanocząstek w terapii celowanej nowotworu jelita grubego. Doktorantka w eksperymentalnej części swojej rozprawy (praca 2) skupia się też na porównaniu oddziaływania uzyskanych nanoukładów na modelowe linie komórek raka jelita grubego (opornych na 5-fluorouracyl DDL-1, CaCo-2 oraz HT-29 wrażliwej na ten cytostatyk), komórek monocytarnych białaczki (THP-1) dwóch linii fibroblastów (CRL-1475 i CCD-112) oraz linii kardiomiocytów szczura (H9C2). Na podkreślenie zasługuje fakt, że zastosowane linie komórkowe reprezentują zarówno komórki nowotworowe jak i prawidłowe.

W tym miejscu zastanawia mnie zastosowanie linii THP-1 jako modelu prawidłowych monocytów. Pomimo że stwierdzenie „prawidłowych” nie pada bezpośrednio w pracy 2 można mieć takie wrażenie. Autorka odnosi uzyskane wyniki do efektów ubocznych 5-fluorouracylu notowanych u pacjentów (monocytopenia) i wskazuje jako pozytywny ograniczony efekt badanych nanoukładów na komórki THP-1 w stosunku do traktowanych bezpośrednio 5-fluorouracylem (str. 11, praca 2). Według mojej wiedzy linia ta reprezentuje komórki ostrej białaczki monocytowej. Tak więc odnotowany efekt cytoprotekcyjny trudno moim zdaniem uznać za pozytywny aspekt działania uzyskanych nanoukładów. Dlaczego więc doktorantka zdecydowała się na wykorzystanie tej linii komórkowej?

Tym nie mniej wykorzystanie innych linii komórek prawidłowych dało możliwość oszacowania specyficzności nanocząstek względem komórek nowotworowych, a także bezpieczeństwa ich stosowania względem komórek zdrowych, co uważam za atut ocenianej rozprawy. Użycie kwasu foliowego jako czynnika kierującego nanocząstki do komórek nowotworowych nie jest rozwiązaniem oryginalnym, jak sama Autorka wskazuje w pracy 2, jednak w przypadku ocenianych badań wybór tego właśnie czynnika jest uzasadniony. Wykorzystanie 5-fluorouracylu jako modelowego cytostatyku jest również uzasadnione, gdyż lek ten jest stosowany w terapii raka jelita grubego. Próba ukierunkowania jego działania poprzez możliwości jakie niesie nanotechnologia polimerów może poprawić skuteczność leczenia przy jednoczesnej redukcji niepożądanych skutków ubocznych, a nawet wspomagać przewyższanie problemu lekooporności nowotworu.

Uzyskane wyniki wskazują, że badane polimery niezależnie od obecności lub braku

5-fluorouracylu nie są czynnikami silnie hemolitycznymi w kontakcie z ludzką krwią. Eksperyment z wykorzystaniem szczurzych kardiomiocytów wykazał, że uzyskane polimery nie wykazują znamion kardiotoxyczności porównywalnych z wolnym 5-fluorouracylem. Podobnie nanocząstki zawierające 5-fluorouracyl wykazywały ograniczony, w porównaniu z działaniem wolnego związku, efekt cytotoxyczny w stosunku do fibroblastów. Wyniki uzyskane w badaniach linii nowotworowych wskazały natomiast, że uzyskane nanocząstki niosące ładunek 5-fluorouracylu pogarszały kondycję komórek nowotworowych nie gorzej niż wolny 5-fluorouracyl, nawet w przypadku linii uznawanych za odporne na działanie tego cytostatyku. Problemem pozostaje tempo uwalniania cytostatyku z nanocząstek. Autorka wnioskuję, że polimerowe nośniki 5-fluorouracylu funkcjonalizowane kwasem foliowym są perspektywiczną alternatywą w stosunku do ogólnoustrojowej terapii tym cytostatykiem. W świetle uzyskanych wyników wniosek taki jest uprawniony. Autorka w badaniach *in vitro* stosowała różne formułacje nanocząstek w dwóch zakresach 0,1 i 0,5 mg/ml pożywki i wolny 5-fluorouracyl w stężeniach 5 i 25 µg/ml, więc zawartość nanocząstek w pożywkach była 20 razy większa w porównaniu z zastosowanym stężeniem wolnego 5-fluorouracylu. Do porównania oddziaływania badanych czynników Autorka zastosowała różne metody dla różnych linii komórkowych. Tu nasuwa się pytanie – jakie stężenia 5-fluorouracylu osiągnano w kulturze po traktowaniu komórek nanocząstkami, jakie znaczenie dla obserwowanych efektów mogą mieć różnice stężeń substancji czynnej? Jakimi kryteriami kierowała się więc Doktorantka dobierając te stężenia? Czy nie lepiej było zastosować szersze zakresy porównywalnych stężeń w przypadku obu sposobów podania cytostatyku, a następnie określić tą samą metodą i porównać ogólnie przyjęte wskaźniki oddziaływania związków chemicznych na kultury komórkowe jak IC₅₀ lub GI₅₀?

Jako że rozprawa doktorska mgr Sylwii Milewskiej została już opublikowana, a tym samym oceniona przez gremia redakcyjne czasopism, podstawową moją rolą jest odpowiedź na dwa ustawowe pytania. Pierwsze – czy Doktorantka w swojej rozprawie prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej (art. 187 punkt 1 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz.U. 2022 poz. 574)? Drugie – czy przedmiotem rozprawy jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego lub oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej (art. 187 punkt 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz.U. 2022 poz. 574)? Moja odpowiedź na oba te pytania jest twierdząca. Badania Doktorantki są ugruntowane solidną wiedzą podstawową czego dowodem są treści

opublikowane w pracy 1 i wstęp do pracy 2. Podjęcie tematu jest logicznie uzasadnione, a uzyskane, oryginalne wyniki wpisują się w najbardziej aktualne trendy onkologii i medycznej biotechnologii (czego dowodem jest praca 2). Dodatkowo, uzyskane wyniki, prócz wartości czysto poznawczej, są perspektywiczne w praktyce klinicznej. Przedstawione w recenzji komentarze mają charakter dyskusyjny i wynikają z różnego podejścia metodycznego w celu uzyskania odpowiedzi na stawiane pytania. Tak więc nie podważają one walorów naukowych rozprawy ale skłaniają do twórczej dyskusji w celu lepszej argumentacji wyciąganych wniosków.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska pani mgr Sylwii Milewskiej spełnia kryteria ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. Tym samym wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku prośbę o dopuszczenie mgr Sylwii Milewskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o zdrowiu.

Adam Tylich.