

Państwowa Uczelnia Zawodowa
im. prof. Edwarda F. Szczepanika w Suwałkach
Wydział Ochrony Zdrowia
ul. Teofila Noniewicza 10, 16-400 Suwałki
tel. 87 562 83 90

Dr hab. n. o zdr. Ewa Kleszczewska, prof. PUZ w Suwałkach
Wydział Ochrony Zdrowia
Państwowa Uczelnia Zawodowa
im. Edwarda F. Szczepanika w Suwałkach

Recenzja

Rozprawy doktorskiej

Doświadczalne oraz farmakoeconomiczne aspekty polimerowych nośników leków mgr Sylwii Milewskiej

wykonana zgodnie z uchwałą nr 1/2023 z dnia 16.10.2023r. w sprawie wyboru recenzentów

Promotor: Dr hab. n. med. Katarzyna Niemirowicz-Laskowska

Promotor pomocniczy: Dr n. chem. Iwona Misztalewska-Turkowicz

Klinika / Zakład: Zakład Farmakologii Doświadczalnej

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. n. med. Halina Car

Nanotechnologia to dynamicznie rozwijająca się, multidyscyplinarna dziedzina nauki, łącząca w sobie zazwyczaj obszary przemysłu i medycyny, a także pośrednio i bezpośrednio związane z nimi dziedziny. Nanotechnologia rozwija się intensywnie od lat 90-tych ubiegłego wieku, i w tym czasie dokonano wielu postępów, przechodząc od badań podstawowych i eksperymentalnych do badań klinicznych i praktycznych jej zastosowań. Obecnie odgrywa istotną rolę w diagnostyce, terapii, a także monitorowaniu i kontroli różnych układów biologicznych, a nanocząsteczki, takie jak polimery, kompleksy metali, liposomy, micelle, dendrymery, mikrokapsułki czy lipoproteiny są wykorzystywane w celu poprawy dostarczania leków czy zwiększenia ich stabilności.

W kontekście farmacji, nanotechnologia znajduje zastosowanie w badaniach nad drogą podania leku, nowych formach leków oraz strukturze chemicznej substancji aktywnej, prowadząc do opracowania leków o obniżonej toksyczności. Jednym z częściej opisywanych aspektów zastosowania nanotechnologii w farmacji jest jej rola w biodystrybucji, dziś nanotechnologia umożliwia precyzyjne skierowanie leku w zamierzony obszar biologiczny, minimalizując skutki uboczne i zwiększając skuteczność terapii.

Produktami nanotechnologii są nanocząstki, które zgodnie z definicją stanowią, przynajmniej w jednym wymiarze, struktury o rozmiarach do 100 nm. Nanostruktury charakteryzują się wyjątkowymi właściwościami, znajdując zastosowanie zarówno w terapii (leczenie celowane, fotouczulanie, hipertermia), jak i w diagnostyce (detekcja, obrazowanie)

Kleszczewska

różnych chorób, zwłaszcza nowotworowych, otwierając nowe perspektywy ich terapeutycznego zastosowania. Nośniki leków budowane na bazie nanocząstek są najczęściej strukturami złożonymi z rdzenia oraz powłoki, która to może być modyfikowana poprzez funkcjonalizację grup powierzchniowych za pomocą ligandów nakierowujących bądź/także ugrupowań chemicznych służących do kompleksowania substancji aktywnej, np. leku, poprawy kompatybilności itp. W piśmiennictwie szczególne znaczenie nadano inteligentnym systemom kontrolowanego dostarczania leków (SDDS) oraz terapii celowanej (TT).

W mojej opinii, istnieje kilka kluczowych powodów, dla których praca „Doświadczalne oraz farmakoekonomiczne aspekty polimerowych nośników leków” jest istotna:

- a) nanotechnologia w medycynie jest obszarem dynamicznym, a jej zastosowania stale się rozwijają; wiele zastosowań nanotechnologii pozostaje na etapie badań laboratoryjnych i wczesnych badań klinicznych, będąc jednocześnie inspiracją dla innych badań,
- b) nanocząstki (ze względu na swoje specyficzne właściwości fizykochemiczne: rozmiar, kształt, powierzchnia właściwa oraz biologiczne: kontrolowane uwalnianie, kompatybilność) mogą być projektowane jako nośniki leków, które dostarczają cytostatyki bezpośrednio do komórek nowotworowych; dzięki temu minimalizuje się uszkodzenia zdrowych tkanek,
- c) nanocząstki mogą być wykorzystane w terapii fotodynamicznej, gdzie specjalnie skonstruowane cząsteczki absorbują światło i przekazują je do cytostatyków; światło aktywuje leki, co zwiększa ich toksyczność wobec komórek nowotworowych,
- d) mikro- i nanoroboty medyczne mogą być programowane do przemieszczania się w organizmie i dostarczania cytostatyków bezpośrednio do obszarów dotkniętych nowotworem; mogą być kontrolowane zdalnie, co pozwala na bardziej precyzyjne dostarczanie leków,
- e) nanocząstki mogą pełnić rolę czujników, które reagują na specyficzne warunki w organizmie, takie jak pH czy obecność biomarkerów nowotworowych, po wykryciu tych warunków nanocząstki mogą uwalniać cytostatyki w celu zniszczenia komórek nowotworowych,
- f) badania związane z nowymi możliwościami zastosowania medycyny spersonalizowanej jak również przybliżanie aspektów farmakoekonomicznych dostarcza istotnych danych, które mogą być wykorzystane w polityce zdrowotnej do redukcji kosztów towarzyszących całemu procesowi leczenia.

Każdy z wymienionych powyżej powodów, został opisany w ocenianej dysertacji.

Kleszczewski

Recenzowana praca doktorska to licząca 128 stron rozprawa, oparta o cykl spójnie tematycznych publikacji:

- I. Milewska Sylwia, Niemirowicz-Laskowska Katarzyna, Siemiaszko Gabriela, Nowicki Piotr, Wilczewska Agnieszka Zofia, Car Halina: Current Trends and Challenges in Pharmaco-economic Aspects of Nanocarriers as Drug Delivery Systems for Cancer Treatment. *International Journal of Nanomedicine*, 2021: 16, s. 6593-6644, IF: 7.033, MNiSW/MEiN: 140.0.
- II. Milewska Sylwia, Siemiaszko Gabriela, Wilczewska Agnieszka Zofia, Misztalewska-Turkiewicz Iwona, Markiewicz Karolina Halina, Szymczuk Dawid, Sawicka Diana, Car Halina, Lazny Ryszard, Niemirowicz-Laskowska Katarzyna: 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, IF: 6.208, MNiSW/MEiN: 140.0.

Pierwsza jest pracą przeglądową odzwierciedlającą nowe możliwości oraz wyzwania leczenia nowotworu jelita grubego z wykorzystaniem nanotechnologii oraz medycyny spersonalizowanej, jak również przybliżeniem aspektów farmakoekonomicznych takich rozwiązań, czyli kosztów towarzyszących całemu procesowi leczenia. Druga praca jest pracą oryginalną, w której zostały ocenione możliwości zastosowania nowych nośników polimerowych sfunkcjonalizowanych kwasem foliowym do ukierunkowanego dostarczania 5-fluorouracylu (5-FU) w terapii nowotworów jelita grubego w modelu *in vitro*. Wymienione powyżej prace znajdują się w bazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych sporządzonych zgodnie z rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie sporządzania wykazów wydawnictw monografii naukowych oraz czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych (Dz. U. poz. 2152 oraz z 2019r. poz. 335). Znajdują się również na Liście Filadelfijskiej oraz w bazach naukowych Medline i SCOPUS. Sumaryczny Impact Factor dla cyklu publikacji jest bardzo wysoki i wynosi 13.241, łączna liczba punktów według listy czasopism punktowanych Ministerstwa Edukacji i Nauki to 280 punktów.

Składającą się z 13 rozdziałów rozprawę, której podstawą są wyżej wymienione artykuły, zgodnie z treścią pracy, zatytułowano „Doświadczalne oraz farmakoekonomiczne aspekty polimerowych nośników leków”. Jej struktura jest typowa dla prac doktorskich opartych na dorobku w postaci opublikowanych artykułów naukowych i zawiera kolejno rozdziały: 1. „Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej” (strona 4), 2. „Wprowadzenie” (strona 5), 3. „Cel pracy” (strona 11), 4. „Realizacja celów naukowych –

Kleszczewski

materiały, metody badawcze, wyniki badań” (strona 12) wraz z podrozdziałami: 4.1. „Materiał i metody”, 4.1.1. „Polimerowe nośniki leków”, 4.1.2. „Synteza i charakterystyka właściwości fizykochemicznych”, 4.1.3. „Ocena właściwości biologicznych”, 4.2 „Wyniki” (strona 14), 5. „Wnioski” (strona 22), 6. „Literatura” (strona 23), 7. „Streszczenie w języku polskim” (strony 30), 8. „Streszczenie w języku angielskim” (strona 32), 9. „Current Trends and Challenges in Pharmaco-economic Aspects of Nanocarriers as Drug Delivery Systems for Cancer Treatment” - praca 1 (strona 34), 10. „Folic-acid-conjugated thermoresponsive polymeric particles for targeted delivery of 5-fluorouracil to CRC cells” - praca 2 (strona 88), 11. „Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej” (strona 114), 12. „Oświadczenia współautorów rozprawy doktorskiej” (strona 115), 13. „Dorobek naukowy” (strona 125) z podrozdziałami: 13.1. „Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską” (strona 125), 13.2. „Wykaz innych publikacji naukowych” (strona 125), 13.3. „Wykaz doniesień zjazdowych” (strona 126) oraz 13.4. „Wykaz innych aktywności naukowych” (strona 128).

Pracę rozpoczyna dwu stronicowy „Wykaz stosowanych skrótów” oraz „Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej”. Następny rozdział to wprowadzenie do tematu badawczego, prezentacja kontekstu i zaprezentowanie na tle innych, potencjalnego znaczenia prac opublikowanych w doktoracie. Autorka prezentuje w nim zastosowanie inteligentnych systemów nanotargetingu jakimi są polimerowe nośniki leków, które zdaniem doktorantki, mogą przyczynić się do znacznej poprawy efektywności dostarczania substancji czynnej zawartej w nośniku bezpośrednio do miejsca zmienionego chorobowego. Może to mieć również przełożenie na poprawę skuteczności leczenia oraz redukcji i nasilenia działań niepożądanych takich jak, np. immunosupresja szpiku kostnego, ostra kardiotoxycznosc oraz przewlekłe zapalenie błony śluzowej jelit. Na podstawie przeglądu literatury i pozyskanej wiedzy, mgr Sylwia Milewska rozważa, w projektowaniu systemów dostarczania leków, elementy składowe, w tym drogę podawania, formulację nośników i późniejszy transport przez błony biologiczne, profil molekularny nowotworu, obecność receptorów powierzchniowych jak również szczególne warunki, jakie panują w miejscu zmienionym chorobowo (pH, temperatura). Podkreśla opinie innych autorów, że trzeba wykorzystać rozwiązania syntetyczne pozwalające na otrzymanie materiałów wrażliwych na bodźce oraz podatnych na dalszą funkcjonalizację powierzchniową, aby kontrola procesu dostarczania oraz uwalniania leku była osiągnięta w sposób ukierunkowany w miejscach objętych procesem patologicznym, w odpowiedzi na określone warunki endogenne lub przy zastosowaniu bodźców zewnętrznych. Doktorantka zwraca też uwagę, na farmakoekonomiczny punkt widzenia. Wdrożenie

Kleane

nośników leków może wpłynąć na obniżenie kosztów bezpośrednich i pośrednich procesu leczenia.

„Wprowadzenie” (wraz z pełnymi tekstami prac 1 i 2) dowodzi bardzo dobrej znajomości wybranej do badań problematyki. **Wartość tej części rozprawy doktorskiej a tym samym przygotowanie teoretyczne Doktorantki oceniam bardzo dobrze.** Podkreślimy: wprowadzenie nanocząstek do terapii i diagnostyki przyczynia się do rozwijania innowacyjnych strategii medycznych, a ich zdolność do precyzyjnego oddziaływania na poziomie molekularnym otwiera nowe horyzonty w dziedzinie medycyny, prowadząc do skuteczniejszych i bardziej zindywidualizowanych form leczenia oraz diagnozowania różnorodnych schorzeń. Cieszy, że nanotechnologia w medycynie pod kątem wdrożenia jest poddana badaniom w Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej kierowanym przez prof. dr hab. n. med. Halinę Car w ramach współpracy z Zakładem Polimerów i Syntezy Organicznej Uniwersytetu w Białymstoku kierowanym przez prof. dr hab. Agnieszkę Z. Wilczewską. Sądzę, że podjęcie przez Doktorantkę badań, które w świetle wiedzy zawartej w bieżącej literaturze przedmiotu posiadają cechy oryginalności, nie jest dziełem przypadku, ale wynikiem współpracy Doktorantki z dr hab. n. med. Katarzyną Niemirowicz-Laskowską i dr n. chem. Iwona Misztalewska-Turkowicz, które na przestrzeni ostatnich lat konsekwentnie prowadzą badania w tym zakresie.

Celem zasadniczym przeprowadzonych badań było rozpoznanie możliwości zastosowania nowych termo wrażliwych nanocząstek polimerowych sfunkcjonalizowanych kwasem foliowym jako nośników 5-FU w terapii raka jelita grubego w modelu *in vitro* wykorzystującym linie komórkowe o zmiennej wrażliwości na chemioterapeutyk. Ocenę aktywności biologicznej (tj. hemokompatybilność i cytotoksyczność) przeprowadzono w stosunku do reprezentantów komórek gospodarza (tj. erytrocytów, monocytów/makrofagów, kardiomiocytów, fibroblastów) jak również do komórek raka jelita grubego o zróżnicowanym profilu molekularnym i wrażliwym na 5-FU. W kolejnym etapie analizowano wpływu badanych nośników na procesy proliferacji komórek nowotworowych oraz ich zdolności do indukcji apoptozy bądź nekrozy. Otrzymane wyniki oceniono analizując wpływu zastosowania rozwiązań na aspekty doświadczalne i farmakoekonomiczne leczenia nowotworu jelita grubego z wykorzystaniem polimerowych nośników leków. **W mojej opinii praca została logicznie zaplanowana, a jej założenia i cele określono jasno i precyzyjnie.**

Rozdział „Realizacja celów naukowych – materiały, metody badawcze, wyniki badań” wraz z podrozdziałami (4.1. Materiał i metody, 4.1.1. Polimerowe nośniki leków oraz 4.1.2. Synteza i charakterystyka właściwości fizykochemicznych) opisują syntezę i charakterystykę,

Heleńska

w tym właściwości fizykochemicznych oraz cechy morfologiczne polimerowych nośników 5-FU. Nośniki leków były otrzymane w wyniku reakcji kontrolowanej polimeryzacji wolnorodnikowej RAFT/MADIX, kopolimery (PHEA-b-PNIPAAm) na bazie akrylanu 2-hydroksyetylu (HEA) i N-izopropyllokrylamidu (NIPAAm) były następnie modyfikowane kwasem foliowym. Nośniki te wykorzystano do enkapsulacji 5-fluorouracylu. Następnie oceniono wydajność procesu enkapsulacji i zawartości leku w nośnikach. W kolejnym etapie, przy użyciu technik i metod: chromatograficznych: SEC, technik spektralnych: NMR, ATR-FTIR, UV-Vis, DLS, potencjał zeta oraz analiz termalnych: TGA, DSC i mikroskopowych: SEM i TEM, nośniki opisano pod względem właściwości fizykochemicznych oraz cech morfologicznych. Kolejno szczegółowo scharakteryzowano otrzymane nośniki na poziomie *in vitro*, w zakresie biokompatybilności z komórkami prawidłowymi badając: erytrocyty ludzkie, komórki monocytów linii THP-1, fibroblastów linii CRL-1475 oraz linii CCD-112 CoN oraz kardiomiocytów linii H9C2 (2-1). Potencjał przeciwnowotworowy nośników zbadano w stosunku do komórek raka jelita grubego linii DLD-1, Caco-2 i HT-29, różniących się profilem molekularnym oraz wrażliwością na chemioterapeutyk (5-FU).

W kolejnym rozdziale Doktorantka szczegółowo opisuje uzyskane rezultaty, kładąc nacisk na: wydajność enkapsulacji około (53%), zawartość leku w nośnikach (9-12%), jednorodność i homogenność kopolimerów oraz biokompatybilność badanych kopolimerów na poziomie *in vitro* (m.in. hemokompatybilności nośników, aktywności metabolicznej komórek, zdolność do proliferacji, efekt cytotoksyczny). (Szczegółowy zapis prowadzonych badań umieszczono w rozdziale 10. „Folic-acid-conjugated thermoresponsive polymeric particles for targeted delivery of 5-fluorouracil to CRC cells” zawierający pełny tekst opublikowanej pracy). W ostatnim etapie tej części dysertacji dokonano oceny potencjału przeciwnowotworowego zsyntetyzowanych kopolimerów.

Aspekt farmakoekonomiczny badań, w optymalizacji farmakoterapii chorób nowotworowych i racjonalizacji wydatków ponoszonych na leczenie, ukazano w oparciu o dane z baz: PubMed, Embase, Cochrane oraz z baz badań klinicznych: INFARMA, Europejska Agencja Leków czy U.S. National Library of Medicine. W tej części pracy zwraca wagę solidny, oparty na gruntownych podstawach warsztat pracy dobrze prezentujący badany aspekt. **Moim zdaniem przedstawione wyniki badań (zamieszczone w doktoracie wraz z wynikami z opublikowanych prac) są przeprowadzone i udokumentowane właściwie.**

Część badawczą zamyka rozdział zawierający następujące **logicznie wnioski**:

1. Nośniki na bazie kopolimerów akrylanu 2-hydroksyetylu (HEA) i N-izopropyllokrylamidu (NIPAAm) sfunkcjonalizowane powierzchniowo ligandem nakierowującym, tj.

Klaudia

cząsteczkami kwasu foliowego charakteryzują dobrze zdefiniowane właściwości fizykochemiczne i cechy morfologiczne, a także biogodność z komórkami gospodarza, przez co są obiecującym materiałem do kreowania nanosystemów, których zadaniem jest selektywny transport leku oraz jego kontrolowane uwalnianie w miejscu docelowego działania.

2. Enkapsulacja 5-fluorouracylu w polimerowym nośniku w sposób istotny moduluje jego cytotoksyczność, poprawia kompatybilność cytostatyku w stosunku do komórek niezmiennych nowotworowo.
3. Zastosowanie systemów dostarczania 5-FU wykazuje działanie protekcyjne na komórki prawidłowe chroniąc przed szkodliwym działaniem cytostatyku, co w konsekwencji może przełożyć się na redukcję działań niepożądanych chemioterapii, takich jak np. immunosupresja szpiku kostnego związana z monocytopenią, ostra kardiotoxyczność oraz przewlekłe zapalenie błony śluzowej jelit.
4. Nośniki z enkapsulowanym 5-FU wykazują silniejsze działanie przeciwnowotworowe niż 5-FU zastosowany w formie wolnej oraz wykazują zdolność do uwrażliwienia komórek nowotworowych na 5-FU, pomimo potwierdzonej oporności na ten chemioterapeutyk.
5. Nanosystemy zawierające enkapsulowany chemioterapeutyk mają zdolność do indukcji apoptozy i nekrozy w traktowanych komórkach nowotworowych, w tym w komórkach charakteryzujących się fenotypem lekooporności.
6. W przypadku przełożenia otrzymanych wyników na warunki kliniczne, przyczyniłoby się to do zwiększenia efektywności terapii, poprawy jakości życia, a w efekcie do wydłużenia całkowitego czasu przeżycia pacjentów.
7. Wprowadzenie nowych substancji i produktów leczniczych na rynek farmaceutyczny takich jak nanosystemy, mogłoby przyczynić się do zapewnienia tańszej i efektywniejszej opieki medycznej, a wdrożenie metody leczenia opartej na nanotechnologii może być przyszłościowym rozwiązaniem umożliwiającym pokonanie ograniczeń konwencjonalnej terapii przeciwnowotworowej.

Pokazują, że przeprowadzone badania mogą stać się kluczowymi obszarami, w których takie badania mają zasadnicze znaczenie. Z punktu widzenia pacjenta główną korzyścią wynikającą z wdrożenia nanocząsteczek w opracowywaniu preparatów leczniczych będzie poprawa bezpieczeństwa leków. Wprowadzenie nanotechnologii do leczenia raka z użyciem cytostatyków ma potencjał zrewolucjonizowania terapii przeciwnowotworowej, poprawiając skuteczność leczenia i jednocześnie minimalizując skutki uboczne. Na koniec wspomnę, że rozprawę, opartą o cykl prac, napisano poprawnym językiem, podkreślając, bardzo wysoki IF.

Jeleniaszka

Podsumowanie

- I. Wysoko pod względem merytorycznym oceniam napisane przez mgr Sylwię Milewską opublikowane prace, wprowadzenie wraz z ukazaniem badanego obszaru i wnioski. Podkreślam: Doktorantka prawidłowo omówiła uzyskane wyniki pokazując je na tle pozycji literaturowych opublikowanych na podjęty w pracy temat.
- II. Stwierdzam, że mgr Sylwia Milewska w czasie realizacji celów pracy doktorskiej prawidłowo przeanalizowała piśmiennictwo (szczegółowo metodologicznie opisane zwłaszcza w pracy 1), co wskazuje na dobrą orientację w problematyce badawczej.
- III. Otrzymane przez Doktorantkę badania opublikowano w prestiżowym, specjalistycznym czasopiśmie naukowym o wysokim, współczynniku cytowalności, co wskazuje, że badania zostały docenione nie tylko przez Recenzentów z International Journal of Nanomedicine oraz International Journal of Molecular Sciences, ale i innych naukowców.
- IV. Wraz z postępem badań nad nanotechnologią, poszerzają się możliwości jej zastosowania w dziedzinie farmacji, otwierając perspektywy na nowe, innowacyjne podejścia do leczenia chorób oraz poprawę skuteczności i bezpieczeństwa stosowanych terapii.

Przychyłam się do zdania, że przyszłość medycyny i farmacji należeć będzie do nanotechnologii. **Pracę ze względu na jej aktualność i włączenie się w nurt badań, oceniam bardzo wysoko, wnosząc - zgodne z regulaminem - o wyróżnienie jej.**

Przekonana w pełni o oryginalności dokonań Doktorantki i dużej wartości poznawczej rozprawy oraz wzorcowym opracowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska jest oryginalnym rozwiązaniem i spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim **wnoszę, do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, o dopuszczenie mgr Sylwii Milewskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki o zdrowiu.**

dr hab. n. o zdr. Ewa Kleszczewska



prof. PUZ w Suwałkach

Białystok, 04.12.2023