

Ocena rozprawy doktorskiej Pana mgr Dominka Lipki zatytułowanej “Nowe liposomowe formułacje antybiotyku przeciwnowotworowego z grupy antracyklin”

Recenzowana praca doktorska Pana mgr Dominika Lipki została wykonana w Zakładzie Lipidów i Liposomów na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem dr. hab. Jerzego Gubernatora. Zakład Lipidów i Liposomów zajmuje się opracowywaniem nowych formułacji liposomowych od wielu lat i prace tego zespołu są rozpoznawalne na całym świecie. Niniejsza praca doktorska jest kontynuacją tematyki tego Zakładu i bazuje na doświadczeniu jego liderów jak i całego zespołu.

Głównym celem recenzowanej pracy doktorskiej było opracowanie innowacyjnego podejścia do liposomowych formułacji powodującego zwiększenie aktywności przeciwnowotworowych i potencjalnie mających szerokie zastosowanie usprawniające działanie nie tylko wybranego do testowania leku, ale szeregu innych leków przeciwnowotworowych o zbliżonych właściwościach fizykochemicznych.

Przestawiona do recenzji rozprawa we wstępie zarysowuje zalety różnych typów nanoformułacji, przedstawia aktualny stan wiedzy na temat formułacji liposomowych, dokładnie analizuje ich różnicujące własności i metody przygotowywania. Analiza pasywnego i aktywnego ukierunkowywania liposomów dobrze wyjaśnia naturę zjawiska jak i pozytywne efekty ich zastosowania.

Czytanie tej części rozprawy wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktoranta do planowania i realizacji badań.

W badaniach testujących skuteczności nowych formułacji liposomowych, jako lek przeciwnowotworowy wybrano epirubicynę. Jest to powszechnie używany lek przeciwnowotworowy należący do klasy związków zwanych antracyklinami. Innymi

powszechnie używanymi lekami z tej klasy związków są dokсорubicyна, daunorubicyна, oraz idarubicyна. Z punktu widzenia mechanizmu działania związki te wiążą się z DNA i uniemożliwiają właściwe działanie enzymu topoisomerazy II. Enzym ten reguluje topologię DNA i posiada zdolności przecinania podwójnej nici DNA, tworzenia wiązania kowalencyjnego z DNA (kompleksu rozszczepialnego DNA-topoisomeraza II), i następnie do odtworzenia (ligacji) wiązań fosfodiesterowych. Antracykliny, popularnie zwane truciznami topoisomerazy II, stabilizują kompleks rozszczepialny DNA-topoisomeraza utrwalając przerwanie podwójnej nici DNA. Utrwalenie uszkodzenia DNA prowadzi do apoptozy i powoduje, że związki te wykazują silne własności przeciwnowotworowe. Niestety jak większość leków przeciwnowotworowych, a cytotoksycznych szczególnie, związki te wykazują znaczne działania uboczne. Opracowanie właściwej formułacji liposomowej pozwoliłoby na zwiększenie indeksu terapeutycznego a w konsekwencji leku bardziej bezpiecznego dla pacjentów o potencjalnie zwiększonej aktywności przeciwnowotworowej. Skuteczność liposomowych formułacji została zademonstrowana dla dokсорubicyны, której liposomowa formułacja (Doxil) prawie całkowicie wyeliminowała z użycia wolną dokсорubicynę.

W podsumowaniu wybór leku (epirubicyна) do testowania skuteczności proponowanych formułacji jak i wybór typów formułacji do badań jest właściwy.

W końcowej części wstępu, w rozdziale poświęconemu antracyklinom są drobne nieścisłości niewpływające na jakość i ocenę pracy, ale są warte przytoczenia: (1) stwierdzenia o niższej kardiotoxyczności epirubicyны (str. 45) w porównaniu z dokсорubicyną nie zostały potwierdzone klinicznie; (2) daunorubicyна została opisana w 1963 czyli wyizolowana ponad 53 lata temu raczej niż 40 lat temu; (3) epirubicyна jest epimerem dokсорubicyны w pozycji C-4' a nie C-4 czyli różnią się orientacją grupy hydroksylowej przy atomie węgla C-4' (str. 46). Przy atomie węgla C-4 w obu związkach znajduje się ten sam podstawnik (OMe); (4) Warto wspomnieć, że metabolizm epirubicyны różni się od metabolizmu dokсорubicyны i odpowiednio wpływa na ich klirens i poziom kardiotoxyczności. Są to fakty, których uwzględnienie pozwoliłoby na lepszą ocenę formułacji epirubicyны i ich porównanie z rynkowo dostępnym Doxilem.

Warto by również zdefiniować często używany w tej pracy zwrot “związki o charakterze słabych zasad” oraz wyjaśnić, używając jeśli możliwe danych fizykochemicznych, wpływ zasadowości na wybór formulacji i potencjalne efekty biologiczne *in vitro* i *in vivo*.

Doktorant w pierwszej fazie badań zaproponował interesujące i wysoce innowacyjne wprowadzenie użycia kwasu askorbinowego i askorbinianu amonu do opracowania unikalnej metody aktywnego zamykania leków w liposomach. Wybór takiego podejścia ma udokumentowane potencjalne szanse na zwiększenie aktywności przeciwnowotworowej testowanych leków. Formulacje z użyciem kwasu askorbinowego i askorbinianu amonu były bardzo dokładnie zanalizowane i porównane z formulacjami używającymi siarczan amonu i wersenian amonu, jak też z wolną epirubicyną i obejmowały zarówno badania *in vitro* jak *in vivo*. Bardzo wyraźny był efekt zwiększonej cytotoksyczności, jak i hamowania wzrostu mysiego nowotworu sutka 4T1 preparatów liposomowych epirubicyny zamkniętej gradientem askorbinianu amonu, jak i kwasu askorbinowego w porównaniu z wolną epirubicyną i grupą kontrolną.

Metody użyte do analizy i porównań były właściwe a rezultaty badań bardzo obiecujące i stanowiły podstawę do wyselekcjonowania typu formulacji do dalszej optymalizacji prowadzącej do opracowania ukierunkowanej liposomowej formulacji dla leku epirubicyna.

Ten drugi etap badań bazował na użyciu kwasu foliowego do zwiększenia selektywności dostarczania leku do komórek nowotworowych. Doktorant zoptymalizował długość linkera PEG z kowalencyjnie przyłączonym kwasem foliowym oraz przetestował wymaganą gęstość występowania kwasu foliowego na powierzchni liposomów do uzyskania zwiększonego efektu cytotoksycznego. Interesujące są też wyniki demonstrujące zwiększone stężenie epirubicyny w jądrach komórek 4T1 po 4h dla formulacji ukierunkowanej w porównaniu z nieukierunkowaną.

Zamiar otrzymania nowej ukierunkowanej formulacji epirubicyny jest ambitny w założeniach, aczkolwiek wybór kwasu foliowego nieco rozczarowuje brakiem nowości. Przy zaprezentowanych zdolnościach doktoranta i wykazaną umiejętnością posługiwania się dostępnym warsztatem badawczym, może warto było rozważyć wybór ligandu wysoce selektywnego dla specyficznego rodzaju nowotworu i opracować metodę do umieszczenia

go na powierzchni liposomów. W połączeniu z wyborem do testowania odpowiednich modeli takiego nowotworu *in vitro* i *in vivo* stanowiłoby to wysoce obiecujące podejście do opracowania nowych formułacji o dużym potencjale translacyjnym i publikacji o wysokim czynniku oddziaływania.

Miejmy nadzieję, że Doktorant będzie miał możliwości kontynuowania takich badań w najbliższej przyszłości i podejmie je jako część dalszego rozwijania swojej kariery naukowej w jednej z instytucji naukowych w Polsce. Taki rozwój kariery zwiększy szanse na jego powrót do Polski z przyszłego zagranicznego stażu naukowego.

W podsumowaniu wszystkie ważne cele pracy doktorskiej zostały zrealizowane a liposomowa formułacja epirubicyny przy użyciu gradientu askorbinianowego może mieć ważne znaczenie praktyczne. Rozprawa doktorska, mimo że zawiera znaczną ilość opisów doświadczeń, informacji wstępnych i dyskusji wyników, jest przedstawiona logicznie i zrozumiale. Doktorant wykazał się umiejętnością stawiania hipotez, wiedzą w projektowaniu doświadczeń i zdolnościami samodzielnego prowadzenia eksperymentów z pogranicza kilku dziedzin.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania przewidziane Ustawą z dn. 18 marca, 2011 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych. Niniejszym wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgr Dominika Lipki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W mojej opinii omawiana praca doktorska jest wysoce innowacyjna, ambitna w swoich zamierzeniach, trudna do realizacji, i zdecydowanie ponad przeciętną. W związku z powyższym, zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.

Z poważaniem,



Prof. Waldemar Priebe