



# UNIwersytet Medyczny

## IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okolów

Recenzja pracy doktorskiej mgr Mohameda Mahmuda pt.: *"The use of liposomal formulations of natural bioactive substances and anthracyclines in combinatory therapy of pancreatic cancer"*

Zachorowania na nowotwory złośliwe w Polsce w ostatnich trzech dekad wzrosły ponad dwukrotnie, osiągając w 2010 roku ponad liczbę 140,5 tys., z czego około 70 tys. u mężczyzn i 70,5 tys. u kobiet. Najczęstszą nowotworową przyczyną zgonu u mężczyzn jest rak płuca, jelita grubego i gruczołu krokowego, natomiast u kobiet rak płuca, gruczołu piersiowego oraz jelita grubego. Do innych, częstych przyczyn zgonu na nowotwory należy również m. in. rak żołądka, pęcherza moczowego oraz trzustki. Rak trzustki występuje wprawdzie nieco rzadziej niż pozostałe nowotwory, lecz cechuje go jeden z wyższych wskaźników umieralności. W Polsce jedynie około 9% pacjentów z rakiem trzustki przeżywa pięcioletni okres od momentu rozpoznania choroby, natomiast w USA i innych krajach Europy Środkowej 5-letni wskaźnik przeżycia jest jeszcze mniejszy i wynosi poniżej 5%. Zgodnie z danymi, które zostały zaprezentowane przez ekspertów ze stowarzyszenia United European Gastroenterology – rak trzustki stanie się w 2017 roku trzecim największym zabójcą wśród nowotworów złośliwych na terenie Unii Europejskiej. Na wysoki wskaźnik śmiertelności z powodu raka trzustki wpływa z pewnością jego późne wykrywanie. Rak trzustki zwykle daje objawy kliniczne wtedy, gdy choroba jest już znacznie zaawansowana, co utrudnia efektywną terapię. W momencie wykrycia, mniej niż 20% raków trzustki jest operacyjnych. Pozostałe 80% chorych, z powodu zaawansowania choroby może być

leczonych jedynie farmakologicznie. W leczeniu wielu nowotworów, oprócz standardowych cytostatyków istnieje również możliwość łączenia ich z dopuszczonymi przez FDA substancjami pochodzenia naturalnego. Do leków wykazujących wysoką efektywność w stosunku do komórek raka trzustki należy m.in. Doxorubicyna, często podawana w terapii skojarzonej z innymi cytostatykami. Chemioterapia w raku trzustki jest jednak mało skuteczna lub powoduje dużo działań niepożądanych, co mocno ogranicza jej wykorzystanie. Jedną z ważniejszych przyczyn niskiej efektywności terapii cytostatykami jest nabywanie przez komórki nowotworowe trzustki wielolekowej lekooporności. Chemioterapeutyki, jako silnie toksyczne leki prowadzą do uszkodzenia nie tylko komórek nowotworowych lecz również komórek zdrowych w wielu narządach (kardio-, nefro- i mielotoksyczność), czego efektem są towarzyszące powikłania. Dlatego badania wielu naukowców koncentrują się nad tzw. terapią celowaną, umożliwiającą dotarcie leku bezpośrednio do komórek nowotworowych, co z kolei pozwoliłoby na zmniejszenie dawki cytostatyku i w konsekwencji zmniejszenie objawów niepożądanych. Jednym z takich obiecujących nośników leków są znane już od wielu lat liposomy.

W świetle powyższych informacji problematyka badawcza podjęta przez Doktoranta jest bardzo nowoczesna. Badania nad możliwością opracowania formułacji liposomowych zawierających standardowe i będące w fazie badań klinicznych cytostatyki oraz wybrane substancje pochodzenia naturalnego mogą dostarczyć informacji na temat nowych możliwości leczenia raka trzustki. Badania te mogą również mieć ogromne znaczenie w kontekście wprowadzenia terapii celowanej u chorych z tym nowotworem.

We „Wstępie” Autor przedstawił wykaz stosowanych skrótów, co niewątpliwie ułatwia przyswajanie zawartych w pracy doktorskiej informacji. W rozdziale tym, Doktorant wprowadza czytelnika w problematykę raka trzustki, ze szczególnym uwzględnieniem zagadnień związanych z jego leczeniem. Następnie, w zwięzły sposób opisuje wybrane, uznane za bezpieczne dla organizmu ludzkiego substancje pochodzenia naturalnego (kurkuminę, kapsaicynę, kwas liponowy i witaminę C), których działanie, głównie anty- i prooksydacyjne mogłoby wspomagać podstawowe leczenie cytostatykami oraz zmniejszać ich działania uboczne. W kolejnej części „Wstępu” Doktorant przedstawia grupę szeroko stosowanych w onkologii cytostatyków, antracyklin, szczegółowo opisując trzy z nich, Doxorubicynę, Epirubicynę oraz Berubicynę, które wykorzystał w prowadzonych badaniach.

Ostatnią część tego rozdziału Doktorant poświęcił na dokładne wprowadzenie czytelnika w problematykę związaną z przygotowywaniem liposomów. Rozdział ten jest napisany bardzo przejrzysto, ilustrowany schematami i nie mam do niego żadnych zastrzeżeń.

„Cel pracy” jest sprecyzowany jasno i zrozumiale. Doktorant podjął się stworzenia nowych formułacji liposomowych, opartych nie tylko na standardowych chemioterapeutykach lecz również zawierających wybrane, naturalne substancje bioaktywne. Drugim celem było określenie dostępności biologicznej oraz wpływu preparatów zamkniętych w liposomach na ludzkie komórki raka trzustki w badaniach *in vitro*.

Umieszczony po tej części rozdział „Materiał i metody” dokładnie opisuje zastosowaną metodykę badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje przejrzystość i staranność przedstawienia materiału badawczego oraz stosowanych technik. Doktorant w jednym podrozdziale zebrał wszystkie stosowane przez siebie odczynniki, podając źródła ich pochodzenia, co niewątpliwie ułatwiło czytanie kolejnych podrozdziałów. Bardzo precyzyjnie opisał technikę tworzenia nowych formułacji liposomów, zamykanie w nich odpowiednich substancji, a także kontrolę ich właściwości farmakokinetycznych (wskaźnika efektywności zamykania, stabilności) oraz obrazowania otrzymanych liposomów z wykorzystaniem Cryo-TEM. Następne części są poświęcone badaniom wpływu opracowanych liposomów na wybrane linie komórkowe raka trzustki, ze szczegółowym opisem zastosowanych technik mających określić biologiczne oddziaływanie odpowiednich substancji zamkniętych w liposomach na badane komórki. Uważam, że wybór metod do oszacowania przeżywalności komórek, poziomu reaktywnych form tlenu, wykrywania apoptozy oraz aktywności enzymów proapoptotycznych jest prawidłowy i gwarantuje wiarygodność otrzymanych wyników.

Rozdział „Wyniki” jest najdłuższym rozdziałem pracy. Biorąc pod uwagę liczbę przeprowadzonych badań, ich złożoność oraz dokonaną analizę statystyczną nie jest to zaskakujące. Rezultaty badań są przedstawione w formie opisowej oraz graficznej, udokumentowane mikrografiami, tabelami oraz wykresami. Dodatkowe wyniki są również przedstawione w zamieszczonym na końcu rozprawy „Załączniku”. Do tej części rozprawy doktorskiej nie mam zastrzeżeń.

Kolejny rozdział, „Dyskusja” jest podsumowaniem otrzymanych rezultatów i ich porównaniem z wynikami otrzymanymi przez innych autorów. Z reguły ta część rozprawy

jest zawsze najtrudniejsza do napisania. Muszę jednak podkreślić szczególnie trudne zadanie jakie miał Doktorant w tej części rozprawy ze względu na konieczność przedyskutowania nie tylko opracowanych formułacji liposomowych, co już jest dużym wyzwaniem lecz również na konieczność analizy efektów biologicznych tych liposomów na komórki linii raka trzustki. Podzielenie tej części rozprawy na podrozdziały niewątpliwie ułatwiło jej zrozumienie. Mam tu jednak kilka uwag. Pierwsza z nich dotyczy cytowań rycin i wykresów, przedstawionych już wcześniej w rozdziale „Wyniki”, co nie powinno mieć miejsca w dyskusji. Kolejna moja uwaga jest związana z licznymi informacjami ogólnymi zawartym w Dyskusji, które wg mnie być=ły, lub powinny być umieszczone we „Wstępie” rozprawy.

W podsumowaniu każdego podrozdziału zostały przedstawione wyczerpujące wnioski, prawidłowo oraz krytycznie interpretujące otrzymane wyniki badań. Doktorant nie ustrzegł się często popełnianego błędu powtarzania we wnioskach otrzymanych rezultatów. Jednak częściowo tłumaczy Doktoranta fakt, iż ich przedstawienie w tym miejscu ułatwia zrozumienia całej dyskusji.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana mgr Mohameda Mahmuda w rzetelny sposób dokumentuje przeprowadzone przez Niego badania oraz spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. nr 65, poz.595 z późn. zm.), dotyczącej nadawania stopni naukowych i tytułu naukowego oraz stopni i tytułu w zakresie sztuki. Wniosuję zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o przeprowadzenie dalszych etapów postępowania w sprawie nadania mgr Mohamedowi Mahmudowi stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę nowatorstwo przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników oraz ich implikacje kliniczne wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr Mohameda Mahmuda.

M. Podmarško Okořo

Wrocław, dnia 26.06.2017