



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Kraków, dnia 23 czerwca 2021 r.

Dr hab. Agnieszka Zagórska
Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM
ul. Medyczna 9
30-688 Kraków

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Martyny Mianowskiej

pt. "Opracowanie liposomowych formułacji wybranych substancji w celu otrzymania skutecznej immunoterapii nowotworu jelita grubego"

Aktualne dane epidemiologiczne opublikowane przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) na temat częstości występowania, śmiertelności i oczekiwanego przeżycia 15 wiodących typów nowotworów, wskazują na wzrostowy trend zarówno częstości występowania, jak i zgonów z powodu nowotworów złośliwych. Co więcej, WHO oszacowała, że w ciągu najbliższych czterech dekad liczba zgonów z powodu raka ma przewyższyć zgony z powodu choroby niedokrwiennej serca. Z każdym kolejnym rokiem rośnie również liczba osób ze zdiagnozowanym nowotworem złośliwym jelita grubego. Standardowe opcje leczenia tej choroby obejmują zabieg chirurgiczny, radioterapię, chemioterapię lub immunoterapię. Każda z nich ma odpowiednie wskazania w poszczególnych stadiach choroby, co nie zmienia faktu, że metody te nierozzerwalnie wiążą się z poważnymi skutkami ubocznymi w trakcie i po leczeniu. Dodatkowo, w przypadku nowotworów litych opracowanie skutecznej immunoterapii jest wyzwaniem ze względu na specyficzne mikrośrodowisko guza oraz zmiany w odpowiedzi immunologicznej. Przedstawione dane uzasadniają podejmowanie badań naukowych w celu poszukiwania nowych opcji terapeutycznych dla nowotworów jelita grubego. Obecne zmiany w strategii zwalczania nowotworów kierują terapię w stronę poszukiwania metod precyzyjnego dotarcia do komórek zmienionych nowotworowo, ich naprawy lub eliminacji. Taka zmiana wymusiła poszukiwanie metod, które reprezentują inne, mniej destrukcyjne dla organizmu, podejście do walki z nowotworami, w porównaniu do standardowej chemioterapii.

W tym kontekście podjęta w recenzowanej rozprawie doktorskiej tematyka dotycząca opracowania liposomowych formułacji wybranych substancji w celu otrzymania skutecznej immunoterapii nowotworu jelita grubego, dobrze wpisuje się w obecne strategie zwalczania nowotworów. Bezpośrednim celem pracy mgr inż. Martyny Mianowskiej było opracowanie efektywnego systemu dostarczania (formułacji liposomowych) substancji selektywnych wobec komórek



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

nowotworu jelita grubego, berberyny oraz imikwimodu dla skutecznej immunoterapii. W tym celu zastosowano opracowaną w Zakładzie Lipidów i Liposomów metodę aktywnego zamykania wykorzystującą gradient jonowy askorbinianu. Uzyskane formułacje zostały następnie scharakteryzowane poprzez wyznaczenie parametrów fizykochemicznych, badania stabilności oraz aktywność biologiczną wobec komórek nowotworowych i kontrolnych prawidłowych. W dalszym etapie realizacji pracy doktorskiej zastosowano trzy modele immunoterapii nowotworu jelita grubego do określenia prawdopodobnego mechanizmu działania formułacji wobec komórek nowotworowych.

Przedstawiona do recenzji praca jest kontynuacją badań prowadzonych w Zakładzie Lipidów i Liposomów Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Kierownik jednostki i jednocześnie promotor pracy doktorskiej, dr hab. Jerzy Gubernator jest naukowcem o bogatym dorobku w zakresie zastosowania nanonośników dla substancji wykazujących działanie przeciwnowotworowe

Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich, z klasycznym podziałem na rozdziały: wstęp, cel badań, opis materiałów i metod do badań, omówienie wyników, dyskusja, podsumowanie i piśmiennictwo. Rozprawa doktorska mgr inż. Martyny Mianowskiej to 210 stron tekstu, 105 rycin i 6 tabel. Tabele i ryciny umieszczone w tekście, znacznie ułatwiają korzystanie z nich w czasie czytania. Piśmiennictwo zebrane w kolejności cytowania liczy 180 pozycji i jest właściwie dobrane i cytowane. Pracę poprzedza streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz stosowanych skrótów i symboli. Wykaz ten ułatwia czytanie wstępu oraz kolejnych rozdziałów.

Wstęp pracy to charakterystyka komórek nowotworowych oraz układu opornościowego, przedstawiona w kontekście immunoterapii nowotworów przy zastosowaniu liposomów. Celem pracy doktorskiej było opracowanie formułacji liposomowych berberyny oraz imikwimodu skutecznych w immunoterapii nowotworu jelita grubego. Doktorantka przygotowywała liposomy zawierające berberynę oraz imikwimod metodą uwadniania cienkiego filmu lipidowego (TFH). Skład lipidowy formułacji to uwodorniona fosfatydylocholina sojowa, cholesterol oraz distearylofatydyloetanolamina modyfikowana glikolem polietylenowym 2000 w stosunku molowym 5,5:4,0:0,5. Dla berberyny Doktorantka przygotowała kilka wariantów formułacji liposomowych. Wszystkie liposomy zostały scharakteryzowane poprzez zmierzenie wielkości oraz współczynnika polidispersji. W dalszym etapie doktorantka dobierała zewnętrzne pH w celu optymalizacji procesu aktywnego zamykania berberyny. Przedmiotem badań doktorantki było także określenie wydajności zamykania w odniesieniu do różnych stosunków wagowych substancja: lipid oraz kinetyka zamykania berberyny w liposomach. W wyniku przeprowadzonych badań stabilności oraz cytotoxyczości wobec komórek nowotworowych, jedna z formułacji została wyselekcjonowana do dalszych badań. Berberyna zamknięta w formie liposomowej



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
W Krakowie

Wydział Farmaceutyczny

przy pomocy gradientu witaminy C, poprzez uszkodzenia mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej, wywołuje stres oksydacyjny, który prowadzi do immunogennej śmierci komórki nowotworowej. Dodatkowo zweryfikowano również hipotezę dotyczącą możliwości wpływu liposomowej postaci berberyny na aktywność żerną makrofagów. Wyniki wskazują, że liposomowa postać berberyny zwiększa fagocytozę w linii komórkowej SW620, nie wykazując takiego wpływu na fagocytozę w przypadku dodatku mysiego przeciwciała anti-CD47. Badania imikwimodu w zakresie przygotowania liposomowej postaci prowadzone były przez doktorantkę w analogiczny sposób jak dla berberyny. Wyniki wskazują, że liposomowa postać imikwimodu nie zwiększała ilości fagocytowanych komórek nowotworowych.

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Martyny Mianowskiej pt. "Opracowanie liposomowych formułacji wybranych substancji w celu otrzymania skutecznej immunoterapii nowotworu jelita grubego" cechuje się istotnymi walorami, do których zalicza się adekwatną do postawionych zadań metodykę, aktualność i wartość praktyczną uzyskanych wyników oraz wartościową dyskusję dowodzącą wiedzy i opanowania tematu przez Autorkę.

Do obowiązków recenzenta należy wskazanie zauważonych błędów formalnych, typograficznych i redakcyjnych popełnionych w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy.

Uwagi natury typograficznej i redakcyjnej

W części wstępnej pracy znajduje się spora ilość niezręczności stylistycznych wynikających z nieprawidłowego tłumaczenia tekstów z anglojęzycznych publikacji na język polski. Również niektóre ze zdań są stanowczo zbyt wielokrotnie złożone. Opisy do rysunków od 1-6 to fragmenty tekstu z rozdziału, są w związku z tym za długie. Również niektóre z rysunków są przedstawiane za pomocą odmiennych kolorów niż w opisie. Rysunek 12 przedstawia w dziwny sposób proces przemiany wiązania dwusiarczkowego, którego prawidłowy lub nieprawidłowy wzór trudno znaleźć w schemacie. W Rysunkach 21-23 (str. 78-79) przeciwciało w dosyć zaskakujący sposób oddziałuje z receptorem. Na str. 61 stwierdzenie „zahamowanie agonistów receptorów PGE2” dotyczy farmakologicznego mechanizmu działania. Mamy agonistów i antagonistów receptorowych natomiast stwierdzenie „zahamowanie agonistów” wymaga wyjaśnienia. W celach pracy doktorskiej (str. 79) w punkcie 2 jest sformułowanie „określenie aktywności wobec...komórek zdrowych”. Bardziej prawidłowe jest określenie „kontrolnych prawidłowych lub normalnych”. W dyskusji (str. 178) jest cytowany tytuł publikacji [157]. Zawartość publikacji w odniesieniu do wzoru chemicznego i podanych charakterystyk wyraźnie wskazuje na berberine chloride (chlorek) a nie hydrochloride (chlorowodorek), tak jak jest to zamieszczone w tytule. Rozumiem, że publikacja przeszła proces recenzji, ale najwyraźniej ośrodki



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

naukowe w Wuhan mają inne standardy nazewnictwa chemicznego. Niemniej, szkoda, że błędny tytuł znalazł się w rozprawie doktorskiej.

Uwagi formalne dotyczą następujących zagadnień:

1. Na Rysunku 14 (str. 59) przedstawiona jest struktura chemiczna chlorku berberyny, a nie jak błędnie podpisano chlorowodorku berberyny. Również w rozdziale VII (Materiały i metody) doktorantka deklaruje stosowanie chlorowodorku berberyny, podczas gdy dokonując opisu przygotowania gradientu używa roztwór wodny berberyny o stężeniu 4 mg/ml. Berberyna to czwartorzędowa sól amoniowa izochinoliny, czyli w swojej budowie zawiera kation NR_4^+ . Dzięki temu chętnie tworzy sole z anionami jednowalencyjnymi, np. chlorkami. Utworzenie chlorowodorku byłoby możliwe w przypadku, gdy atom azotu posiadałby wolną parę elektronową, czyli zdelokalizowany ładunek ujemny. W ten sposób może dojść do przyłączenia protonu z HCl i utworzenia odpowiednio chlorowodorku, tak jak to obserwujemy dla innego alkaloidu izochinolinowego, np. papaweryny. Różnice te są bardzo istotne z punktu widzenia wpływu rodzaju soli substancji biologicznie aktywnej na parametry fizykochemiczne decydujące chociażby o rozpuszczalności w wodzie i lipidach, a co za tym o penetracji przez bariery biologiczne. Bardzo proszę o doprecyzowanie, jaka sól berberyny była przedmiotem badania wraz z charakterystyką jej fizykochemicznych parametrów, takich jak logP, pKa, logD.
2. W charakterystyce otrzymanych formułacji nie ma wyznaczonego potencjału Zeta. Jest tylko współczynnik polidispersji. Dlaczego?
3. Zastosowanie metody opartej na fluorescencji dioctanu dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH-DA) do wizualizacji produkcji reaktywnych form tlenu jest dyskusyjne. Owszem, metoda jest powszechnie stosowana ale w ostatnich latach sugeruje się, że nie jest ona do końca wiarygodna. Jednym z powodów jest fakt, że produkt reakcji utlenienia DCFH-DA, czyli dichlorofluoresceina może sama reagować z tlenem i w ten sposób stymulować powstawanie ROS, sztucznie podnosząc ich poziom. Czy rozważano zatem inne metody do oznaczania i wizualizacji produkcji reaktywnych form tlenu?
4. W dyskusji brakowało mi omówienia działania przeciwnowotworowego samej witaminy C, które w wielu publikacjach było wykazywane na różnych liniach komórek nowotworowych. Dla zwolenników tzw. alternatywnych form terapii raka stanowi to naukowy dowód na skuteczność witaminy C w leczeniu nowotworów. Jest to ogromnie niebezpieczne dla pacjentów, którzy szukają każdej z możliwych form leczenia gwarantującego trwałą remisję. Z witaminą C mamy problem, ponieważ w zależności od rakowej linii komórkowej indukuje szlak apoptotyczny lub nekroptotyczny. Stosując gradient witaminy C do zamykania berberyny w formie liposomowej



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

synergizm w mechanizmach działania biologicznego wydaje się oczywisty. Główny akcent dyskusji został jednak przeniesiony na aktywność związaną z berberyną. Proszę o podanie powodu dla którego od początku prowadzenia badań możliwy synergizm działania witaminy C i berberyny nie był brany pod uwagę?

5. W dyskusji (str. 180) omawiana jest publikacja, w której stosowano nanocząstki PLGA. (Na marginesie, prawidłowe tłumaczenie nazwy tego związku to: kopolimer kwasu polimlekowego i kwasu glikolowego). Niektóre fragmenty publikacji wymagałyby dodatkowych wyjaśnień a nie tylko zacytowania. Po pierwsze, berberyna jest alkaloidem, w postaci stałej, proszkiem, więc nie może mieć odczynu. Odczyn to cecha roztworu elektrolitu zależna od równowagi między właściwościami kwasowymi i zasadowymi substancji rozpuszczonych w roztworze. Jestem ciekawa jaki odczyn ma roztwór chlorku berberyny? Następnie stwierdzenie, że „w środowisku bardziej zasadowym berberyna będzie bardziej stabilnie przyłączona do nonocząsteczek zawierających cząsteczki PLGA” jest przynajmniej dziwne. Po pierwsze, w środowisku zasadowym PLGA jako polimer zbudowany z monomerów kwasowych może sam ulegać rozpadowi. Po drugie, proszę o wyjaśnienie co Autorka rozumie przez określenie „berberyna będzie bardziej stabilnie przyłączona”?

Pragnę jednak podkreślić, że przedstawione uwagi w żadnym stopniu nie wpływają na wartość merytoryczną pracy.

Mając na uwadze oryginalność oraz wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Martynty Mianowskiej pt. „Opracowanie liposomowych formułacji wybranych substancji w celu otrzymania skutecznej immunoterapii nowotworu jelita grubego” stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane dysertacjom doktorskim określone w obowiązującej ustawie stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr inż. Martynty Mianowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Agnieszka Zagórska

Katedra Chemii Farmaceutycznej
Zakład Chemii Leków


Dr hab. Agnieszka Zagórska
Adiunkt