



Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk

Zakład Farmakologii Doświadczalnej
Prof. dr hab. Paweł Grieb – Kierownik
Tel: (+48) 22 60 86 474
Fax: (+48) 22 60 86 527
e-mail: pgrieb@imdik.pan.pl

Warszawa, 08.09.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Jana Procka
p.t. „Projektowanie, wytwarzanie i charakteryzacja nanofarmaceutyków
na przykładzie disulfiramu”

Nowotwory złośliwe są jednym z głównych zagrożeń zdrowotnych w krajach wysoko rozwiniętych. Mimo wprowadzania do kliniki leków o nowatorskich mechanizmach działania (takich jak inhibitory kinaz, czy przeciwciała monoklonalne) podstawą chemioterapii onkologicznej pozostają „klasyczne” leki cytotoksyczne, które są z reguły bardziej toksyczne dla komórek nisko zróżnicowanych i szybko dzielących się (proliferujących), a znacznie mniej dla komórek wysoko zróżnicowanych i nieproliferujących. Jednak w organizmie pacjenta chorego na nowotwór złośliwy oprócz komórek nowotworowych komórkami szybko dzielącymi się są także zdrowe komórki szpiku kostnego, komórki nabłonkowe, itp. Toteż lek cytotoksyczny podany układowo, np. doustnie lub infuzją dożylną, działa toksycznie nie tylko na komórki nowotworowe, lecz również na zdrowe, szybko proliferujące komórki, wywołując niebezpieczne efekty niepożądane takie jak małopłytkowość, leukopenia, anemia itp. Wiele leków stosowanych w chemioterapii nowotworów powoduje ponadto zaskakujące efekty niepożądane, działając toksycznie np. na miocyt mięśnia sercowego. Innym poważnym problemem związanym z „klasyczną” chemioterapią nowotworów jest zjawisko lekooporności, narastająca podczas terapii utrata wrażliwości komórek nowotworowych na leki cytotoksyczne. Z powyższych względów poszukiwanie nowych podejść do chemioterapii nowotworów należy nieustająco do priorytetowych zagadnień farmacji i medycyny.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgr inż. Jana Procka wpisuje się w ten priorytet. Ma ona charakter interdyscyplinarny, gdyż dotyczy z jednej strony technologii nanocząsteczkowych form leków, a z drugiej strony - na przykładzie disulfiramu - jej potencjału do praktycznego zastosowania w terapii nowotworów. Tematyka rozprawy jest - moim zdaniem - bardzo trafnie wybrana. Nanocząsteczkowe (w szczególności liposomalne) formy leków znajdują coraz więcej zastosowań w onkologii, stwarzając możliwości selektywnego kierowania chemioterapeutyków do ognisk nowotworowych i - co za tym idzie - potęgowania efektów leczniczych przy zmniejszaniu efektów niepożądanych. Natomiast disulfiram, jest dla onkologii lekiem bardzo interesującym, gdyż nie jest „klasycznym” cytostatykiem i jest marginalnie toksyczny wobec komórek nienowotworowych.

Rozprawa jest w sposób typowy podzielona na rozdziały, przy czym rozdzielone zazwyczaj w rozprawach doktorskich części *Wyniki* i *Dyskusja* są połączone w jeden rozdział. Jest to opracowanie obszerne, liczące 94 strony tekstu podstawowego, 77 rycin (fotografii i wykresów) oraz spis 196 cytowanych pozycji literaturowych. Układ pracy jest klarowny i przejrzysty.

Wstęp zawiera liczące 25 stron wprowadzenie w tematykę badań podjętych przez Doktoranta. Najpierw, bardzo skrótowo lecz trafnie, przedstawione są w nim korzyści, jakie dla terapii onkologicznych może przynieść zastosowanie nanofarmaceutyków. Następnie, kompetentnie, w oparciu o dobrze dobrane piśmiennictwo, Autor omawia farmakologię disulfiramu w aspekcie tradycyjnego zastosowania tej substancji do tzw. awersyjnej terapii alkoholizmu. Nie mogę się jednak w tym momencie powstrzymać od uzupełnienia informacji podanych przez Pana Doktoranta o pewne zaskakujące fakty związane z wczesną historią tej substancji. Disulfiram, zsyntetyzowany w Berlinie w roku 1881 przez Grodzkiego, 20 lat później znalazł zastosowanie w przemyśle gumowym jako akcelerator procesu wulkanizacji. W roku 1937 amerykański lekarz nazwiskiem Williams opisał w liście do czasopisma JAMA nietolerancję alkoholu etylowego wywołaną u robotników eksponowanych w fabryce gumy na pył zawierający disulfiram i zasugerował, że substancja ta mogłaby służyć do leczenia alkoholizmu. Sugestia ta nie doczekała się praktycznego zastosowania aż do roku 1943, kiedy podobny efekt zauważyli duńscy biochemicy Jacobsen i Hald, którzy w Kopenhadze prowadzili badania z disulfiramed jako potencjalnym lekiem przeciwko pasożytom jelitowym. Tolerancję na ten specyfik badacze ci sprawdzali na sobie samych, a odkrywając, iż wywołuje on silną nietolerancję na alkohol etylowy - doprowadzili do jego praktycznego zastosowania do leczenia alkoholików.

Następny podrozdział *Wstępu* dotyczy poszukiwania nowych wskazań dla znanych leków, co jest określane w literaturze angielskiej terminem *repurposing*. Skrótowe, ale trafne poruszenie tego tematu umożliwiło Autorowi zgrabne przejście do kluczowego dla rozprawy doktorskiej zagadnienia przeciwnowotworowej aktywności disulfiramu. Słusznie wskazał On, że jednym z mechanizmów odpowiadających za aktywność przeciwnowotworową tej substancji jest nieodwracalne hamowanie dehydrogenaz aldehydowych (to dzięki temu znalazła ona zastosowanie w terapii awersyjnej alkoholizmu), podczas gdy drugi ważny mechanizm toksyczności disulfiramu wobec komórek nowotworowych związany jest z chelatowaniem jonów cynku i przede wszystkim miedzi. Ze względu na wykształcenie Autora, które nie jest medyczne ani biologiczne, lecz techniczne, pozytywnie zaskoczyły mnie liczne i trafne odwołania do wyników badań klinicznych dotyczących stosowania disulfiramu w terapii onkologicznej, przygotowane nie tylko na podstawie naukowej literatury medycznej, ale także prowadzonego przez amerykańskie *National Library of Medicine* i *National Institutes of Health* rejestru badań klinicznych *ClinicalTrials.gov*.

Kolejny podrozdział *Wstępu* poświęcony jest pierwotnemu rakowi wątroby zwanemu także rakiem wątrobowokomórkowym bądź hepatomą. Omówione są w nim epidemiologia i etiopatogeneza tego nowotworu, oraz aktualnie stosowane strategie terapeutyczne. Muszę przyznać, że zdziwiło mnie to, co Pan Doktorant napisał na str. 14,

a mianowicie, że *Strategia leczenia raka wątrobowokomórkowego obemuje we wczesnej fazie resekcję wątroby lub jej transplantację, zależnie od ilości i wielkości ognisk choroby*. Wydawało mi się bowiem, że transplantacje narządowe są zawsze „ostatnią deską ratunku”, tak jak to jest w przypadku przeszczepów serca albo nerek. Jednak, nie będąc transplantologiem, postanowiłem nie krytykować tego, co Pan Doktorant napisał, bez sprawdzenia. No i na moje szczęście, bo w przyjętych w roku 2012 międzynarodowych rekomendacjach w sprawie przeszczepów wątroby u pacjentów z hepatomą stwierdzono, że - ze względu na ograniczoną podaż narządów - przeszczepy te należy wykonywać jedynie u pacjentów z niewielkim obciążeniem organizmu nowotworem, gdyż wyniki leczenia przeszczepem są u takich pacjentów najlepsze.

W obszernym podrozdziale 2.6. *Nośniki leków* omówione są różne rodzaje nanofarmaceutyków, takie jak polimery, micelle, czy dendrimery. Najwięcej uwagi Autor poświęca liposomom, przedstawiając nie tylko ich strukturę, ale również podstawowe metody ich otrzymywania i wprowadzania do nich substancji farmakologicznie czynnych, które - co z pozoru wydaje się oczywiste - są odmienne dla leków hydrofilowych i lipofilowych. Sporo uwagi poświęcił Autor metodom „aktywnego zamykania” substancji w liposomach - przy czym może trafniejszym byłby tu termin „aktywne ładowanie”.

Rozdział *Cele i założenia pracy* zwięźle podaje postawione przez Autora zadania badawcze. Kolejne rozdziały, *Materiały* i *Metody* zawierają dane dotyczące wykorzystanych w pracy materiałów oraz różnorodnych metod badawczych. Godny podkreślenia jest fakt zastosowania przez Doktoranta szerokiej gamy technik badawczych oraz samodzielne opracowanie metod analitycznych wykorzystanych do przeprowadzenia doświadczeń opisanych w rozprawie. Należy zauważyć, że zastosowane techniki – zarówno ogólnie znane, jak i nowo opracowane przez Doktoranta, są adekwatnie dobrane do celów badań. Doświadczenia zostały przeprowadzone rzetelnie i opisany sposób ich wykonania nie budzi żadnych zastrzeżeń.

W połączonym rozdziale *Wyniki i Dyskusja* Autor wykazał się dobrą znajomością literatury przedmiotu oraz dojrzałością interpretacji uzyskanych wyników. Duże wrażenie robią rozmieszczone w poszczególnych rozdziałach liczne ryciny. Rozprawę wieńczy rozdział „Podsumowanie”, w którym Autor rekapitułuje założenia i cel pracy oraz zgrabnie przedstawia uzyskane wyniki i płynące z nich wnioski, wykazując zrealizowanie założonego celu oraz podkreślając dodatkowe osiągnięcia – w tym opracowanie nowych metod badawczych.

Doktorant przeprowadził potrzebne i nowatorskie badania mające na celu opracowanie nowej formy leku dla terapii raka wątrobowokomórkowego. Dobór modelu doświadczanego został dokonany właściwie i był poparty dogłębną znajomością fizjologii wątroby i patofizjologii raka wątrobowokomórkowego. W pracy przedstawiono kolejne etapy prowadzące do uzyskania nanofarmaceutyku. Zawarty jest w niej m.in. opis szeroko zakrojonych badań nad różnymi formami nośników liposomowych oraz nad lokalizacją disulfiram w wprowadzanego do nośnika w jego dwuwarstwie lipidowej. Doktorant wykazał, że disulfiram znajduje się w centralnej części dwuwarstwy lipidowej. W kolejnym kroku

analizował możliwość opracowania nośników zawierających disulfiram i jony miedzi, wzmacniające efekt terapeutyczny. Badania te zaowocowały m.in. opracowaniem techniki pozwalającej na zamykanie w liposomach zadowalającej ilości wprowadzanego kompleksu.

Na potrzeby pracy Doktorant opracował ilościowe metody analityczne umożliwiające chemiczne i fizykochemiczne scharakteryzowanie wytworzonych liposomów. Metody te, oparte przede wszystkim na wysokosprawnej chromatografii cieczowej, posłużyły do określania składu wytworzonych liposomów. Doktorant badał również zachowanie się we krwi liposomowej formy disulfiramu i profil jego toksyczności wobec wybranych linii komórkowych. Badania cytotoxyczności wykazały, że podawanie disulfiramu w postaci liposomowej nie zmienia efektu toksycznego wywieranego na komórki w porównaniu do disulfiramu rozpuszczonego w DMSO.

Niewiele można zarzucić rozprawie Pana mgr inż. Jana Procka, toteż krytyczna część recenzji nie będzie zbyt obszerna. Moje główne zarzuty dotyczą kolejności omawiania zagadnień. Wydaje mi się, że tematyka podrozdziału 2.1. *Nanofarmaceutyki w terapii przeciwnowotworowej* jest najbliższa tematyce podrozdziału 2.6. *Nośniki leków*, podczas gdy rozdzielające je podrozdziały 2.2., 2.3. i 2.4. dotyczące disulfiramu łączą się tematycznie z podrozdziałem 2.7. *Disulfiram w nanonośnikach*. Z kolei rozdział *Wyniki i dyskusja* rozpoczyna się podrozdziałem 6.1. *Strategia dostarczania nanofarmaceutyków do raka wątrobowokomórkowego*, w którym przede wszystkim przedstawione są podstawowe informacje o budowie i funkcjach zdrowej wątroby, a mniej miejsca zajmują informacje na temat charakteru zmian patologicznych związanych z hepatomą, które mają znaczenie dla projektowania nanofarmaceutyków mających dostarczać lek preferencyjnie do ognisk tego guza. Informacje o budowie i funkcjach zdrowej wątroby nie mają w istocie znaczenia dla tematyki rozprawy, natomiast opis charakteru zmian patologicznych w hepatomie jest nieco zbyt pobieżny. W szczególności brak tam - jak i w całej rozprawie - informacji na temat naczyń limfatycznych w ogniskach nowotworowych - a przecież sądzi się, że to właśnie zmiany naczyń limfatycznych w obrębie ognisk nowotworów złośliwych mają kluczowe znaczenie dla selektywnego wychwytu nanofarmaceutyków takich jak liposomy. W każdym razie tematyka tego podrozdziału nie dotyczy ani wyników ani ich dyskusji, lecz raczej założeń pracy - toteż powinien on być umieszczony we wstępie.

Pozostałe uwagi krytyczne mają już znaczenie zupełnie marginalne. Większość ilustracji ma zbyt małe rozmiary, co znacznie utrudnia ich przyswojenie. Dla przykładu, widma emisyjne pokazane na ryc. 37 (str. 57) i ryc. 38 (część lewa) nakładają się na siebie tak dokładnie, że dużo czasu zabrało mi zrozumienie, że ryciny te faktycznie pokazują widma uzyskane dla liposomów z różną zawartością disulfiramu. (Trzeba było podać w opisie ryciny, że widma nakładają się na siebie). We wstępie, w *Tabeli 2* dotyczącej składników nanofarmaceutyków testowanych pod kątem dostarczania leków do raka wątrobowo-komórkowego wymieniona jest *atorwastatyna*, inhibitor syntezy cholesterolu - który co prawda ma aktywność przeciwnowotworową, ale cytowana przez doktoranta publikacja nie dotyczy użycia tego leku do terapii nowotworu, lecz do obniżania stężenia cholesterolu w krwi. Z kolei na początku *Dyskusji*, na str. 54, Pan Doktorant dwukrotnie użył nazwy *Komórki Borowicza-Kupfera* - podczas gdy właściwa nazwa tych komórek, osiadłych

makrofagów znajdujących się między komórkami śródbłonna w ścianie naczyń zatokowych wątroby, to *komórki Browicza-Kupfera*.

Powyższe uwagi nie wpłynęły jednak w znaczącym stopniu na ocenę rozprawy, którą oceniam bardzo pozytywnie. Z przyczyn wskazanych powyżej uważam, że spełnia ona warunki określone w artykule 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym ... i w związku z tym składam Wysockiej Radzie Politechniki Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie pana mgr. inż. Jana Procka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje także o wyróżnienie rozprawy.

