



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Kraków, dnia 18 maja 2023 r.

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

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Adama Markowskiego

pt.” Zastosowanie nowych nanoformulacji bajkaleiny i kwasu ursolowego w celu zwiększenia ich biodostępności i aktywności wobec gruczolakoraka trzustki w badaniach *in vitro*”

Przedłożona do recenzji praca doktorska Pana mgr Adama Markowskiego została wykonana w Zakładzie Lipidów i Liposomów, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Promotorami pracy są dr hab. Jerzy Gubernator i Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk.

Rozprawa doktorska ma formę zbioru 3 spójnych tematycznie prac oryginalnych, opublikowanych w latach 2021-2023 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym ze współczynnikiem oddziaływania (IF), który sumarycznie wynosi 16.48 i odpowiada 420 punktom MNiSW. We wszystkich pracach Pan mgr Adam Markowski jest pierwszym autorem, a oświadczenia współautorów wskazują na wiodący wkład Doktoranta w ich powstanie.

Celem pracy doktorskiej Pana mgr Adama Markowskiego było opracowanie nanonośników dla bajkaleiny i kwasu ursolowego, wykazujących potencjał terapeutyczny w leczeniu raka trzustki. Zgodnie z tytułem pracy podjęte działania badawcze miały na celu zwiększenie biodostępności i aktywności w/w związków wobec gruczolakoraka trzustki.

W przedmiotowym cyklu, pierwsza publikacja dotyczyła opracowania i optymalizacji procesu produkcji nanocząstek polimerowych PLGA z enkapsulowanym kwasem ursolowym. Doktorant przygotował metodą nanoprecypitacji trzy różne PLGA z enkapsulowanym kwasem ursolowym uzyskując średnio 45% wydajności zamykania. Dalsza analiza dotyczyła charakteryzacji rozmiaru, polidispersyjności, potencjału zeta, długoterminowej stabilności preparatów. Aktywność biologiczna formułacji względem komórek dwóch linii gruczolakoraka



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

trzustki wyrażona poprzez IC_{50} wynosiła poniżej $15 \mu M$. Badania te uzupełniono o analizę mikroskopową wybarwionych cząstek polimerowych, która wykazała, akumulację nanocząstek w cytoplazmie komórek dwóch linii raka trzustki.

Druga publikacja z cyklu stanowi rozwinięcie badań. Doktorant zaprojektował oraz opracował nową kontrolowaną metodę produkcji hybrydowych nanocząstek lipidowo-polimerowych zawierających kwas ursolowy. Ponownie do produkcji zastosowano metodę nanoprecypitacji jednak zmodyfikowano skład fazy olejowej. Oprócz rozpuszczonego PLGA i kwasu ursolowego, zastosowano mieszaninę fosfolipidów w ściśle określonym stosunku wagowym. Po przygotowaniu szeregu formułacji, do dalszych badań wybrano formułację z otoczką zbudowaną z czystej lecytyny sojowej oraz PEG-yłowanej distearylofosfatydylocholiną w odpowiednich stosunkach (85 : 15). Dla tej formułacji określono rozmiar, polidispersyjność, potencjał zeta, długoterminową stabilność, dynamikę i charakter opłaszczania nanocząstek przez fosfolipidy. Opracowany proces technologiczny pozwolił na uzyskanie hybrydowych nanocząstek o wyższej wydajności procesu zamykania (powyżej 65%) w porównaniu do „standardowych” czyli nanocząstek nieopłaszczonych fosfolipidami. Co więcej, wydajność procesu zamykania dla hybrydowych nanocząstek okazała się być wartością stałą niezależną od stosunku ilości kwasu ursolowego do polimeru. Hybrydowe nanocząstki lipidowo-polimerowe z kwasem ursolowym wykazały aktywność biologiczną wyrażoną IC_{50} poniżej $20 \mu M$ wobec dwóch linii komórkowych raka trzustki. Jednak aktywność ta nie była specyficzna.

Ostatnia z cyklu publikacja dotyczyła procesu technologicznego i określenia aktywności biologicznej enkapsulowanej w nośniku liposomowym bajkaleiny. Ten flawonoid jest praktycznie nierozpuszczalny w wodzie, co uniemożliwia zbadanie potencjału terapeutycznego bajkaleiny w podaniu dożylnym. W procesie produkcji liposomów typu LUV zastosowano metodę uwodnienia zliofilizowanego cienkiego filmu lipidowego inkorporowaną w nim bajkaleiną. Do kompozycji fosfolipidowej wybrano dimirystylofosfatydylocholinę (DMPC) oraz distearylofosfatydyloetanolaminę (DSPE-PEG 2000) w stosunku molowym 95:5. Późniejsza charakterystyka produktu wykazała, że w wyniku uwodnienia uzyskano zawiesinę liposomów MLV, dla której określono rozmiar i homogenność, wraz z potencjałem zeta. Wartość potencjału zeta była wystarczająca dla podania dożylnego. W pracy przedstawiono również proces



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

optymalizacji warunków enkapsulacji bajkaleiny z uwzględnieniem zmiennych takich jak temperatura oraz stosunek lipid : bajkaleina. W kolejnych etapach zbadano stabilność formułacji z uwzględnieniem wpływu białek osocza, określono wygląd liposomalnej bajkaleiny oraz jej internalizację do komórek. Aktywność biologiczna enkapsulowanej w nośniku liposomowym bajkaleiny była większa niż 20 μM wobec dwóch linii komórkowych raka trzustki i była specyficzna. Praca została uzupełniona o porównanie aktywności biologicznej uzyskanej na komórkach czyli dwuwymiarowym modelu, z aktywnością na hodowli sferoidowej, modelu trójwymiarowym.

Zakres prac badawczych opisanych w artykułach oryginalnych oraz interpretacja ich wyników, nie wymagają dodatkowego komentarza. Natomiast należy podkreślić oryginalność metody rozwiązania problemu, szczególnie w przypadku hybrydowych nanocząstek lipidowo-polimerowych kwasu ursolowego.

Część teoretyczna pracy doktorskiej jest podzielona na rozdziały dotyczące etiologii, biologii i problematyki związanej z gruczolakorakiem trzustki, znaczenia nanotechnologii w terapiach nowotworowych oraz charakterystyki biologicznych właściwości bajkaleiny i kwasu ursolowego. Po przeglądzie publikacji stanowiących cykl, Doktorant zamieszcza dyskusję. W dyskusji jednym z ważnych elementów jest świadomie podejmowane wyzwania dotyczące optymalizacji procesów technologicznych z uwzględnieniem ekonomicznych i ekologicznych kosztów produkcji. Całość pracy wskazuje, że Doktorant posiada niezbędną wiedzę teoretyczną oraz, że może samodzielnie prowadzić pracę naukową. Dodatkowo mgr Adam Markowski umiejętnie wprowadza w tematykę badawczą, stawia jasno sformułowane hipotezy badawcze i odpowiednio dobiera metody badawcze do zbadania hipotez. Analiza także krytyczna otrzymanych wyników oraz umiejętność ich interpretacji na tle literatury przedmiotu jest dodatkowym atutem pracy.

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

Uwagi natury formalnej:

- Biodostępność - sformułowana w tytule oraz w dalszej części pracy. W rozumieniu nauk o leku dostępność biologiczna to szybkość i stopień wchłaniania substancji leczniczej



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
W Krakowie

Wydział Farmaceutyczny

z postaci leku. To część substancji aktywnej biologicznie, która z podanej dawki dostaje się do krążenia ogólnego oraz szybkość wchłaniania tej substancji. Treść pracy doktorskiej sugeruje, że termin biodostępność jest stosowany w kontekście biodostępności komórkowej (intracellular bioavailability). Proszę o wyjaśnienie i rozwinięcie problemu.

- Rysunek 4 – Schemat enkapsulacji gradientem jonowym z wykorzystaniem siarczanu amonu. Wymagana jest poprawa ładunków i form jonowych prezentowanych związków.
- Metody przygotowania nanocząstek PLGA – w charakterystyce metody pojawia się zdanie o konieczności oczyszczenia finalnego produktu z organicznych rozpuszczalników. Niejednokrotnie na różnych etapach procesu produkcji leku wymagane jest zastosowanie rozpuszczalników organicznych. Co więcej, odpowiedni wybór rozpuszczalnika do syntezy lub ekstrakcji substancji leczniczej może zwiększyć wydajność lub określić właściwości takie jak: forma krystaliczna, czystość i rozpuszczalność. Dlatego też rozpuszczalnik w niektórych przypadkach może być krytycznym elementem stosowanym w procesie produkcji leku. W produkcji leków należy je usunąć do takiego poziomu, aby spełnione zostały wymagania GMP, specyfikacje produktu lub inne wymagania jakościowe. Czy w przypadku nanocząstek PLGA dopuszczalne limity rozpuszczalników resztkowych w produktach leczniczych zostały określone?
- Zdanie z podrozdziału o bioaktywnych związkach pochodzenia naturalnego, strona 40. „Nie bez znaczenia jest również zmniejszona toksyczność ogólnoustrojowa związana ze stosowaniem związków naturalnego pochodzenia, na co wpływa przede wszystkim stwierdzana w wielu przypadkach specyficzność działania tych związków wobec komórek nowotworowych”.

Zdanie jest jednym z pokutujących mitów. Nie można sugerować, że związki pochodzenia naturalnego są lepszymi lekami onkologicznymi od syntetycznych leków lub „mniejszymi truciznami” bo pochodzą z natury. Przez takie skróty myślowe, część pacjentów zamiast chemioterapii lekami syntetycznymi prowadzonej w warunkach klinicznych, wybiera zielarza do terapii onkologicznej. Związki pochodzenia naturalnego o działaniu przeciwnowotworowym to przeważnie duże cząsteczki o skomplikowanej



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

budowie chemicznej (nie zawsze w pełni potwierdzonej) i jak każda substancja chemiczna w zależności od dawki mogą być toksyczne. Na marginesie, poszukując jednocześnie nowych, syntetycznych leków przeciwnowotworowych trzeba wykazać ich specyficzne działanie w odniesieniu do komórek nowotworowych. Brak specyficzności działania, może skutkować wstrzymaniem badań nad dalszym rozwojem

Uwag natury typograficznej i redakcyjnej jest niewiele co świadczy o dużej staranności w przygotowaniu manuskryptu rozprawy. Aczkolwiek na stronie 8 rozpoczyna się zdanie nadmiernie długie (6 linijek) i wielokrotnie podrzędnie złożone, przez co zatracą sens. Sformułowanie proto-onkogenne ciosy na stronie 10, brzmi mało profesjonalnie. Strona 35 zdanie dotyczące braku toksyczności PLGA stylistycznie zagmatwane, porównuje strukturę PLGA polistyrenu. Rysunki w pracy nie mają ujednoliconego stylu, formatu oraz wersji językowej przez co tracą na jakości (*vide* Rysunek 3) lub brak legendy powoduje że nie są dobrą ilustracją dla opisywanych zjawisk (*vide* Rysunek 4). Pragnę jednak podkreślić, że przedstawione uwagi w żadnym stopniu nie wpływają na wartość merytoryczną pracy.

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Adama Markowskiego spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Adama Markowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuję także o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Dr hab. Agnieszka Zagórska

Katedra Chemii Farmaceutycznej
Zakład Chemii Leków


Dr hab. Agnieszka Zagórska
Adiunkt



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Kraków, 18.05.2021

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pt. "Zastosowanie nowych nanoformulacji bajkaleiny i kwasu ursolowego w celu zwiększenia ich biodostępności i aktywności wobec gruczolakoraka trzustki w badaniach *in vitro*".

Uzasadnienie:

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi zbiór 3 spójnych tematycznie prac oryginalnych, opublikowanych w latach 2021-2023 w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym ze współczynnikiem oddziaływania (IF), który sumarycznie wynosi 16.48 i odpowiada 420 punktom MNiSW. We wszystkich pracach Pan mgr Adam Markowski jest pierwszym autorem a oświadczenia współautorów wskazują na wiodący wkład Doktoranta w ich powstanie. Atutem rozprawy jest duża wartość aplikacyjna wyników badań.

Dr hab. Agnieszka Zagórska

Katedra Chemii Farmaceutycznej
Zakład Chemii Leków


Dr hab. Agnieszka Zagórska
Adiunkt