

Łódź 01.03.2020

Prof. dr hab.n. med. Marlena Broncel  
Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej,  
Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
ul. Kniaziewicza 1/5, 91-347 Łódź  
tel/fax 42 251 60 03, tel. 607698372  
e-mail:marlena.broncel@umed.lodz.pl

### OCENA

rozprawy doktorskiej *magistra Kamila Janusza Durki*

zatytułowanej: „Cytotoksyczność liposomalnych taksanów funkcjonalizowanych peptydem gH625 wobec ludzkich komórek śródbłónka mikrowaskularnego”

*promotor- prof. dr hab.med. Aneta Koceva-Chyła*

Taksany to jedne z najbardziej skutecznych leków przeciwnowotworowych nowej generacji. Używane są w terapii neoadiuwantowej, mającej na celu remisję zmian pierwotnie nieoperacyjnych, oraz w terapii adiuwantowej, stosowanej po leczeniu chirurgicznym w celu wydłużenia czasu przeżycia. Głównym miejscem ich działania są mikrotubule cytoszkieletu komórkowego. Interakcje pomiędzy taksanami i mikrotubulami zaburzają funkcje wrzeciona podziałowego, uniemożliwiają prawidłowe rozdzielenie chromatyd siostrzanych i chromosomów homologicznych podczas podziału komórki, co prowadzi do zahamowania mitozy. Działanie taksanów, tak jak innych inhibitorów mitozy, jest fazowo specyficzne i dotyczy faz S, G2 i M cyklu. Zatrzymanie cyklu komórkowego w G2/M uruchamia wiele mechanizmów, kierujących komórkę na drogę apoptozy.

Stosowane klinicznie taksoidy: paklitaksel (PTX) i docetaksel (DTX) należą do taksanów I generacji. Mimo podobnej budowy oba leki znacznie różnią się aktywnością przeciwnowotworową i toksycznością. Dotychczasowe badania wykazały, że DTX, dzięki swoim unikalnym właściwościom i szerokim zakresie działania, przewyższa skutecznością PTX. Istniejące obecnie schematy chemioterapii z zastosowaniem taksanów charakteryzują się wysokim ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych. Ponadto pojawiająca się oporność

komórek nowotworowych na stosowane leki powoduje, że chemioterapia jest często nieskuteczna. Sposobem na ominięcie zjawiska oporności czy poprawę przeciwnowotworowych właściwości związków terapeutycznych jest opracowywanie nowych systemów ich dostarczania.

Uważam, że w świetle przytoczonych danych temat dysertacji jest bardzo interesujący i ma istotne znaczenie praktyczne. Monografia jest napisana bardzo dobrym językiem, z przyjemnością się ją czyta.

Dysertacja doktorska wnosi bardzo ciekawe spostrzeżenia na temat skuteczności i bezpieczeństwa enkapsulacji PTX i DTX w pegylowanym liposomie skoniugowanym z peptydem gH625. Myślę, że uzyskane przez Doktoranta wyniki stanowią zachętę do dalszych badań przedklinicznych, które przyczynią się do zainicjowania prób klinicznych. Mam nadzieję, że w niedalekiej przyszłości stosowanie PTX lub DTX w formie liposomalnej będzie standardem onkologicznym, a ja będę mogła się pochwalić, że byłam recenzentem tak znakomitej pracy.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska ma typowy układ rozpraw doktorskich. Składa się z rozdziałów, takich jak: wstęp, założenia i cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, wnioski, bibliografia. Ponadto rozprawa zawiera 16 tabel i 29 kolorowych rycin. Całość uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim. Brakuje wykazu rycin i tabel.

*We wstępie* omówiono historię taksanów jako leków przeciwnowotworowych oraz metody ich otrzymywania. Z reguły w pracy doktorskiej, szczególnie o charakterze doświadczalnym, jakiegokolwiek doniesienia historyczne czytane są pobieżnie, o ile w ogóle są analizowane przez recenzenta. Doktorant już na samym początku mile zaskakuje. Historia taksanów jest przedstawiona w sposób niezwykle ciekawy. Autor pokazuje jak ekologia, ochrona środowiska może wejść w kolizję z ratowaniem życia ciężko chorych ludzi. Ten rys historyczny uzmysławia nam, że sukcesy medycyny mają często zabarwienia szare i nie są jednoznaczne z punktu każdego aspektu życia. Pozwolę przytoczyć fragment tekstu dysertacji: **str. 11** „Otrzymanie 1kg taksolu, który wystarczał dla ok. 50 pacjentów, wymagało użycia 10 ton kory cisa. Produkcja ta wiązała się z wycięciem 3000 drzew. Leczenie jednego pacjenta wymagało więc poświęcenia ośmiu 600-letnich cisów krótkolistnych. Ze względu na ryzyko wycięcia wszystkich cisów poproszono Departament Spraw Wewnętrznych USA o włączenie zachodniego cisa krótkolistnego na listę gatunków zagrożonych oraz powołano specjalny program (*Pacific Yew Act*), który miał na celu ochronę tego gatunku”. **str.12** „Ograniczona dostępność taksolu skłoniła badaczy do poszukiwań innych źródeł pozyskiwania tego związku. Dopiero w 1994 udało się opracować całkowitą syntezę

paklitakselu. Ze względu na złożoność procesu i niską wydajność nie zastosowano tej syntezy na skalę przemysłową. Obecnie paklitaksel i docetaksel wytwarzane są głównie na drodze półsyntetycznej z prekursora 10-deacetylobakatyiny III (10-DAB) pozyskanego z cisów lub hodowli komórek roślinnych”. Str.13 „*Bristol-Myers Squibb*, wiodący dostawca taksolu, posiada plantację z 30 miliardami cisów, z których pozyskuje korę i igły niezbędne do ekstrakcji półproduktów“.

Z przytoczonego tekstu nasuwa się refleksja, że ratowanie życia człowieka za wszelką cenę jest nadrzędnym dobrem w pojęciu jednostkowym, ale może mieć zupełnie inny wymiar globalny.

Kolejne 3 rozdziały wstępu (1.2, 1.3, 1.4) dotyczą budowy chemicznej, zastosowań klinicznych taksanów i ich molekularnych mechanizmów aktywności przeciwnowotworowej. Na stronie 16 w podrozdziale 1.3.2 Doktorant zastosował niezbyt trafne określenie medyczne „zmiany częstości skurczów serca”. Usprawiedliwieniem jest fakt, że doktorant nie jest lekarzem. Znacznie lepszym pojęciem byłoby „zaburzenia rytmu serca”. Podejrzewam również, że w zdaniu: „zastosowanie solubilizatorów taksanów znacząco zwiększa występowanie działań nieporządných” wystąpiła tzw. literówka i zamiast „nieporządných” powinno być „niepożądanych”. Jeżeli jednak nie jest to przekłamanie automatycznego edytora tekstu, to poprosiłabym o ustosunkowanie się do tego określenia. Analizę podrozdziałów 1.3.1, 1.3.2; 1.4 znacznie ułatwiłaby zbiorcza tabela porównująca właściwości dwóch omawianych leków: paklitakselu i docetakselu. Warto dodać, że PTX ma nieliniową farmakokinetykę według modelu dwukompartamentowego, charakteryzującą się zmiennością stężenia leku w zależności od podawanej dawki. Farmakokinetyka DTX przedstawia się zaś liniowo według modelu trójkompartamentowego. Pole pod krzywą stężenia leku (AUC) jest wprost proporcjonalne do podanej dawki i niezależne od klirensu. Przypuszcza się, że większa aktywność przeciwnowotworowa DTX może wynikać z jego liniowej farmakokinetyki i dłuższej retencji w komórce. Lek ten ma dużą objętość dystrybucji około 13 l.

Oddzielnym, bardzo ważnym podrozdziałem wstępu jest 1.5, w którym Doktorant omawia mechanizmy działania peptydów penetrujących błony komórkowe (*CPP-cell-penetrating peptides*), przedstawia ich klasyfikację w zależności od pochodzenia i mechanizmu penetracji błon biologicznych. Dla mnie, jako lekarza, bardzo ważnym jest podrozdział 1.5.3 poświęcony zastosowaniu CPP w badaniach klinicznych. Doktorant rewelacyjnie opisał próby zastosowania różnego rodzaju CPP, biorąc pod uwagę nie tylko onkologię, ale również inne dziedziny medycyny jak okulistykę, dermatologię,

neurochirurgię. Na stronie 25 Doktorant, wskazując na skuteczną rolę CPP w dostarczaniu różnych rodzaju związków stosowanych w leczeniu wielu chorób, wymienił między innymi infekcje wirusowe, bakteryjne, kardiologię. Ta ostatnia z pewnością nie jest chorobą.

Niepowodzenia badań klinicznych, często dopiero w III fazie pokazują jak daleka bywa droga od badań doświadczalnych do etapu wdrożenia substancji. W niektórych przypadkach badania zostały przerwane ze względu na bezpieczeństwo lub brak skuteczności, w innych pomimo bardzo obiecujących rezultatów w badaniach przedklinicznych firmy, z powodów finansowych, zaprzestali dalszych badań. Autor podkreśla, że najbardziej obiecującym wydaje się obecnie peptyd NA-1, który skutecznie przenika przez błony komórkowe, zakłóca wewnątrzkomórkowe oddziaływania receptora NMDAR z białkiem zagęszczenia postsynaptycznego PSD-95, co w efekcie zapobiega syntezie tlenku azotu oraz dalszej sygnalizacji neurotoksycznej. Preparat znajduje się w III fazie badań klinicznych. Zwrócono przede wszystkim uwagę na jego neuroprotektoryjne właściwości u pacjentów po wewnątrznaczyniowym leczeniu tętniaka mózgu.

*Założenia i cel pracy* zostały sformułowane prawidłowo, w sposób prosty i przejrzysty, nie budzą żadnych zastrzeżeń. Autor zaprojektował swoją pracę badawczą logicznie i następnie wykonał konsekwentnie. Przedstawił uzasadnienie tematu badań, wyboru komórek endotelialnych. Na stronie 34 umieścił bardzo istotny zapis, iż wymienione nanoformy taksanów nie były dotychczas badane, co stanowi bez wątpienia największą wartość tej pracy i dowodzi jej oryginalności. O dojrzałości naukowej Doktoranta świadczy prawidłowo skonstruowana hipoteza i jej weryfikacja.

*Warsztat badawczy* oraz miejsce wykonywania badań w Katedrze Biofizyki Medycznej Instytutu Biofizyki pod kierownictwem Pani Profesor Anety Koceva- Chyły, we współpracy z profesorem Stefani Galdieri z Neapolu, tylko i wyłącznie utwierdzają mnie w rzetelności przeprowadzanych badań i wiarygodności uzyskanych wyników.

Opis stosowanych metod nie budzi żadnych zastrzeżeń, wręcz zaskakuje dużą skrupulatnością.

*Wyniki* dysertacji przedstawiono na 52 stronach, przeplatając tekst niezwykle czytelnymi kolorowymi rycinami i tabelami, co niewątpliwie znacznie ułatwiło ocenę obszernego materiału badawczego. Na pochwałę zasługuje skrupulatność i konsekwencja opisu uzyskanych wartości liczbowych. Język zastosowany w omówieniu wyników jest precyzyjny i nie zawiera żadnych skrótów myślowych ani fraz emocjonalnych.

*Dyskusja* jest bardzo dobrze przeprowadzona i przemyślana. Doktorat logicznie wiąże swoje obserwacje z aktualnym piśmiennictwem. Jedyne czego mi brakuje to jakie są ograniczenia pracy i czy niektóre wyniki mimo, że bardzo obiecujące, należy interpretować ostrożnie.

Z badań Doktorant wyciąga 4 zwięzłe *wnioski* stanowiące odpowiedzi na cele pracy.

W tekście rozprawy Autor powołuje się na 229 pozycji literaturowych, ułożonych alfabetycznie, w tym 149 pozycji pochodzi z ostatniego dziesięciolecia, w większości oryginalnych prac anglojęzycznych, opublikowanych w czasopismach o wysokim IF.


Po przeczytaniu tej znakomitej dysertacji nurtuje mnie kilka pytań:

1. Jednym z czynników powodujących oporność na taksany jest nadekspresja białek z rodziny ABC, związanych z ATP-zależną pompą usuwającą leki poza komórkę. Do białek tych zalicza się produkt genu MDR1 – glikoproteinę P (P-gp), białko MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1) oraz białko BCRP (breast cancer resistance protein). Oporność komórki na taksany może także wynikać ze zmian w strukturze tubuliny i mikrotubul, spowodowanych przez mutacje, zmienionej dynamiki mikrotubul i różnic w ekspresji izotypów tubuliny. Czy zastosowanie nanoosiłnika liposomalnego i peptydu gH625 zmniejszy oporność komórek nowotworowych na taksany i w jakim mechanizmie?
2. W dysertacji, w szczególności w dyskusji nie znalazłam odniesienia wyników Pana pracy do dostępnego w praktyce klinicznej nab-paklitakselu- cząsteczki leku zamkniętej w mikrokapsułkach z albuminą? Czy uważa Pan, że ta forma leku będzie stanowić w badaniach klinicznych układ odniesienia do nowych nanoform?
3. Jakich spodziewa się Pan trudności we wdrażaniu badanych przez Pana nanoform taksanów w przyszłości, wyłączając oczywiście aspekt finansowy?
4. Czy może Pan wyjaśnić, na podstawie dostępnego piśmiennictwa, dlaczego do tej pory żaden preparat leku cytostatycznego enkapsulowanego w liposomach z dołączonym CPP nie uzyskał zgody FDA na zastosowanie w terapii onkologicznej?

Nadmienienia wymaga fakt, że sformułowane przeze mnie uwagi i pytania mają jedynie sprowokować Autora do dyskusji i oczywiście nie zaprzeczają wysokiej, merytorycznej wartości pracy .

Przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Uważam, że spełnia ona wszystkie warunki *określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U2003 nr 65, poz 595 z późn.zm.)*. Dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu. Doktorant wykazał się dużą wiedzą teoretyczną i posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

**Mam zaszczyt i niewątpliwą przyjemność przedstawić Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne wnioski o dopuszczenie magistra Kamila Janusza Durki do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnioskuję o wyróżnienie pracy.**



Prof. dr hab.n.med. Marlena Broncel

prof. dr hab. n. med. Marlena Broncel  
specjalista chorób wewnętrznych  
i farmakologii klinicznej  
5 7 6 7 4 5 2