



prof. dr hab. n. farm. Łukasz Komsta
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Chemii Leków
ul. Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin, tel. 81 4487387

Recenzja pracy doktorskiej mgr Marleny Paździor-Heiske

***„Wybrane nośniki do sporządzania formulacji terapeutycznej
chemioterapeutyku przydatnego w onkologii”***

CHOROBY nowotworowe stanowią nadal jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny, a prognozy wskazują na znaczny wzrost zachorowań w najbliższych latach. Nic nie wskazuje na to, aby trend ten miał się zmienić. Oprócz wprowadzania do terapii nowych substancji przeciwnowotworowych, bardzo istotnym wątkiem badań jest opracowywanie efektywnych systemów dostarczania leków, które pozwolą na dotarcie substancji czynnej bezpośrednio do ogniska nowotworowego, jednocześnie ograniczając efekt toksyczny wobec całej reszty żywego organizmu.

Specjalne, *targetowane* dostarczanie do tkanki nowotworowej ogranicza niepożądane efekty terapii konwencjonalnym dawkowaniem, takie jak szybka eliminacja leku z organizmu, konieczność wielokrotnego dawkowania, jak również potrzeba zwiększania stężeń do osiągnięcia efektu terapeutycznego. Optymalizacja nośników nie jest łatwym zadaniem, a idealny nośnik leku w terapii celowanej powinien spełniać całą listę warunków, takich jak stabilność biochemiczna obojętność, biokompatybilność, biodegradowalność, zdolność do transportu odpowiedniej dawki terapeutycznej oraz kontrolowana i przewidywalna szybkość uwalniania.

Wybór tak odważnego tematu w przedłożonej do recenzji pracy, wykonanej pod promotorstwem dr hab. VIOLETY KOZIK w Instytucie Chemii Uniwersytetu Śląskiego, należy ocenić wysoko. Ma ona formę typowej dysertacji o objętości 204 strony, która została zdeponowana w elektronicznym Archiwum Prac Dyplomowych Uniwersytetu Śląskiego. Do recenzji przekazano oprócz pliku z sumami kontrolnymi oprawiony wydruk pracy, który zawiera dodatkowo odbitki dwóch obrzernych dotychczas opublikowanych prac: pierwszej w *International Journal of Molecular Sciences*, a drugiej w *Pharmaceutics*.

Rozprawa skupia się na poszukiwaniu i wyselekcjonowaniu optymalnych nośników dla chemioterapeutyków w terapii onkologicznej w kontekście poprawy skuteczności leczenia i minimalizacji działań niepożądanych takiej terapii. Badania Doktorantki obejmowały syntezę i analizę różnych

substancji będących potencjalnymi nośnikami, a ostatecznie do dalszych, bardziej szczegółowych badań Autorka wybrała liposomy.

Część teoretyczna pracy zawiera wszelkie potrzebne informacje do wprowadzenia czytelnika w tematykę i udowadnia ogólną wiedzę Doktorantki w podjętej dziedzinie. Doktorantka przedstawia pojęcie leku, procesy ADME, indeks terapeutyczny, definicje dawek. Omawia zalety systemów kontrolowanego uwalniania leków, które zapewniają stałe stężenie leku w osoczu przez dłuższy czas, w przeciwieństwie do konwencjonalnych metod. Opisuje również lipofilowość jako cechę kluczową dla rozpuszczalności, wchłaniania i rozkładu leku w organizmie, łącznie z metodami jej oznaczania. Autorka dokonuje również przeglądu nanonośników: pochodnych tlenków grafenu, egzosomów, hydrożeli na bazie chitozanu oraz haloizytu, albumin i liposomów.

Jednostronicowy cel pracy jest sformułowany oszczędnie, ale konkretnie i właściwie. Doktorantka podjęła się selekcjonowania i zbadania nośników do sporządzania formulacji terapeutycznej. Po wstępnych badaniach nad pochodnymi tlenków grafenu, egzosomami, hydrożelami na bazie chitozanu i haloizytem, liposomy zostały uznane za najbardziej obiecujące nośniki i stały się głównym przedmiotem dalszych badań. Taka strategia badawcza udowadnia umiejętność Doktorantki w zakresie projektowania badań wstępnych i decydowania o dalszej pracy na podstawie tych wstępnych wyników.

Autorka przygotowała 18 nowych układów liposomalnych, zawierających dokсорubicynę, binimetynib oraz nowy związek 9-PBThACl, zarówno pojedynczo, jak i w kombinacjach. Liposomy otrzymano zmodyfikowaną metodą odparowywania w odwróconej fazie. W celu zbadania wpływu warunków fizjologicznych na uwalnianie leków, do formulacji liposomalnych dodano również albuminę surowicy ludzkiej (HSA) oraz jej formę pozbawioną kwasów tłuszczowych (dHSA). Badania prowadzono w kilku temperaturach przy kilku wartościach pH.

Rozkład wielkości cząstek Doktorantka analizowała za pomocą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) i analizy śledzenia nanocząstek (NTA), co pozwoliło potwierdzić, że liposomy mają średnicę poniżej 100 nm (ok. 70 nm) i są dobrze zdyspergowane. Ich stabilność badano przez pięć tygodni, przechowując próbki w temperaturze 4°C i cotygodniowo mierząc szybkość uwalniania leku. Pomiar spektrofotometryczny w zakresie UV i światła widzialnego wykorzystano do rejestracji widm absorpcji leków i ich kompleksów z liposomami i albuminami w różnych temperaturach i pH.

Proces uwalniania leku oceniano przez 5 godzin w różnych warunkach temperatury i pH, a uzyskane profile dopasowywano do sześciu modeli matematycznych w celu określenia kinetyki procesu. Zastosowano mikroskop fluorescencyjny do wizualnej oceny struktur liposomów i oceny zmian w ich

kształcie i wielkości w zależności od zawartości i warunków środowiskowych, wykorzystując barwienie błękitem Nilu. Autorka określiła również wartości teoretyczne i eksperymentalne lipofilowości dla Binimetynibu, Doksorubicyny i 9-PBThACl w celu określenia powiązań z pozostałymi wynikami.

Do oceny statystycznej wykorzystano analizę głównych składowych (PCA), metodę hierarchicznej analizy skupień (HCA) oraz jednoczynnikową analizę wariancji. Wyniki potwierdziły, że efektywność kapsułkowania jest silnie uzależniona od pH środowiska. Obciążenie lekiem również było zależne od pH. Największe różnice w uwalnianiu związków zaobserwowano przy pH 6,5, gdzie procent kapsułkowania był mniejszy. Wykazano, że uwalnianie leku z liposomów zależy od otaczającego pH oraz umiejscowienia leku w nanonośniku.

Analiza spektrofotometryczna wykazała interakcje między lekami w formulacjach złożonych i pozwoliła zidentyfikować wartość pH, przy której profile właściwości kompleksów liposomalnych ulegały zauważalnym zmianom. Ocena uwalniania leku wykazała, że zarówno pH, jak i temperatura mają bezpośredni wpływ na profile uwalniania leków z liposomów. Profile uwalniania najczęściej najlepiej dopasowywały się do funkcji wykładniczych lub rozszerzonego modela Freundlicha.

Wzrost temperatury do 41°C destabilizował układy liposomalne, co sugeruje, że pH otoczenia może zmieniać właściwości termiczne kompleksów. Stwierdzono, że obecność albuminy (HSA i dHSA) również wpływa na kinetykę uwalniania leków, zmieniając konfigurację fosfolipidów. Uzyskane przez Autorkę mikrofotografie potwierdziły kuliste kształty liposomów i pozwoliły na obserwację zmian wielkości i rozmieszczenia.

Badania lipofilowości pozwoliły na stwierdzenie, że teoretyczne wartości $\log P$ różnią się w zależności od użytego oprogramowania, co wskazuje na brak uniwersalnego programu do precyzyjnego wyznaczania tego parametru. Najwyższe korelacje z danymi eksperymentalnymi uzyskano dla programów SybylX i Osiris.

Analiza wielowymiarowa pozwoliła na pogrupowanie formulacji na podstawie ich profili uwalniania. Wyraźnie oddzielono liposomy zawierające Doksorubicynę od tych z 9-PBThACl, a kompleksy liposom-lek-albumina tworzyły odrębne skupienia, co potwierdza wpływ albuminy na właściwości uwalniania leku. Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) potwierdziła istotny statystycznie wpływ pH środowiska oraz temperatury na stopień uwalniania enkapsulowanych leków z badanych układów liposomalnych. Szkoda jedynie, że wyniki PCA, zarówno w publikacji, jak i w dysertacji, nie zawierają wektorów obciążeń oraz ich interpretacji. Taka możliwość jest kluczową cechą PCA i zwykle pozwala na znaczne poszerzenie uzyskanych wniosków. O tym, czy w tym przypadku taka interpretacja wniosłaby coś nowego, można podyskutować na obronie pracy.



Recenzowana rozprawa stanowi odpowiedzi na istotne z punktu widzenia nauki pytania, a do najważniejszych jej osiągnięć należy zaliczyć:

- wyselekcjonowanie liposomów jako najbardziej obiecujących nośników w badanej terapii
- potwierdzenie skuteczności metodologia odparowywania w odwróconej fazie (mREV) do przygotowania stabilnych liposomalnych formułacji
- stwierdzenie, że obecność albuminy wyraźnie modyfikuje termiczny profil kompleksów leków zamkniętych w liposomach
- zaobserwowanie interakcji pomiędzy lekami w formułacjach złożonych.



Podsumowując, praca doktorska mgr Marleny Paździor-Heiske spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669). Wnioskuje zatem o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 29 lipca 2025.