

Prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg
Katedra Nanobiotechnologii
Instytut Biologii
SGGW w Warszawie

Ocena rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Malwiny Czerwińskiej

„Nanozeolit NaA funkcjonalizowany przeciwciałem anti-PSMA i znakowany radionuklidem ^{223}Ra jako potencjalny radiofarmaceutyk dla celowanej terapii raka stercza”

przygotowanej pod kierunkiem

Pani prof. dr hab. Anny Lankoff oraz Pana prof. dr hab. Aleksandra Bilewicza

Informacje ogólne o pracy

- Recenzja, przedstawionej mi do oceny pracy, została przygotowana na podstawie pisma Pani dr Katarzyny Kiegiel Sekretarza Rady Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie RN/35/2021 z dnia 16.08.2021

Rozprawa doktorska stanowi zwarte opracowanie, przygotowane w języku polskim, liczące 210 stron, 65 rysunków i 27 tabel. Struktura pracy jest standardowa, charakterystyczna dla prac doktorskich i zawiera następujące części; streszczenie, summary, część literaturową, cel pracy, materiał i metody, wyniki i dyskusję, wnioski, spis literatury, załączniki. Praca, pod względem formalnym, jest przygotowana zgodnie z zasadami, obowiązującymi podczas pisania tego rodzaju opracowań naukowych, zawiera wszystkie niezbędne elementy pozwalające na przygotowanie jej formalnej oceny. Opracowanie stanowi logicznie skonstruowaną całość, pozwalającą na ocenę poziomu naukowego badań, spójności cyklu badań i sformułowanie końcowego wniosku.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska „Nanozeolit NaA funkcjonalizowany przeciwciałem anti-PSMA i znakowany radionuklidem ^{223}Ra jako potencjalny radiofarmaceutyk dla celowanej terapii raka stercza” została przygotowana na podstawie cyklu następujących publikacji;

Czerwińska M, Bilewicz A, Kruszewski M, Wegierek-Ciuk A, Lankoff A. Targeted Radionuclide Therapy of Prostate Cancer-From Basic Research to Clinical Perspectives. *Molecules*, 2020, 25(7):1743. (IF5 4,587; Q2; c. 20)

Czerwińska M, Fracasso G, Pruszyński M, Bilewicz A, Kruszewski M, Majkowska-Pilip A, Lankoff A. Design and Evaluation of ^{223}Ra -Labeled and Anti-PSMA Targeted NaA Nanozeolites for Prostate Cancer Therapy-Part I. *Materials*, 2020, 13(17):3875. (IF5 3,92; JCR Q2; c. 6)

Lankoff A, **Czerwińska M**, Walczak R, Karczmarczyk U, Tomczyk K, Brzóska K, Fracasso G, Garnuszek P, Mikołajczak R, Kruszewski M. Design and evaluation of ^{223}Ra -labeled and anti-PSMA targeted NaA nanozeolites for prostate cancer therapy-Part II. Toxicity,

pharmacokinetics and biodistribution. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11): 5702. (IF₅ 6,132; JCR – Q1)

Publikacje zostały zamieszczone w bardzo dobrych czasopismach naukowych jak Molecules, Materials i Journal of Molecular Sciences w latach 2020 – 2021. Kandydatka jest pierwszym autorem w dwu pracach i drugim autorem w jednej publikacji. Udział Pani mgr Malwiny Czerwińskiej w przygotowaniu wymienionych publikacji był bardzo znaczący i dotyczył kluczowych dla jej przygotowania zadań, a między innymi sformułowaniu celu badań, udziału w doświadczeniach i procesie analitycznych a przede wszystkim w przygotowaniu pierwszej wersji publikacji, co znalazło odzwierciedlenie w zaświadczeniach podpisanych przez współautorów publikacji.

Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska została przygotowana na podstawie wymienionych wyżej publikacji, jednak z bardzo wyraźnym poszerzeniem części dotyczącej przeglądu literatury, stosowanych metod doświadczalnych i dyskusji. Co więcej rozprawa, w swej części końcowej zawiera dyskusję, podsumowanie i wnioski, które pozwalają na tematyczne powiązanie publikacji, ich syntezę i ogólne podsumowanie.

Część literaturowa pracy doktorskiej jest bardzo obszerna, zawiera istotne, ściśle powiązane z pracą i aktualne informacje i wyniki badań dotyczące raka prostaty i jego terapii jak również informacje ogólniejsze, podstawowe, wprowadzające do tematu. Autorka, przede wszystkim skoncentrowała się na przybliżeniu współczesnych metod terapii celowanej stosowanej w leczeniu raka prostaty. Wybór molekuly, której ekspresja jest silnie zwiększona w komórkach nowotworowych i która może stanowić łatwy do osiągnięcia cel dla związków terapeutycznych jest kluczowy. Kandydatka przedstawiła molekularne podłoże mechanizmu i skuteczność terapii z zastosowaniem: antygenu komórek macierzystych prostaty PSCA, sześciobłonowego antygenu nabłonkowego prostaty STEAP, receptorów sprzężonych z białkiem G oraz najbardziej korzystnego z punktu widzenia potencjalnej terapii celowanej - membranowego receptora stercza PSMA. W dalszej części Autorka dość szczegółowo przedstawiła strategię zastosowania tego receptora z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych lub niskocząsteczkowych inhibitorów enzymatycznych PSMA. W kolejnej części przeglądu literatury Autorka omówiła najnowsze osiągnięcia w sferze poszukiwania nowych, bardziej optymalnych radionuklidów z uwzględnieniem szczegółowego przeglądu emiterów elektronów Augera, promieniowania beta i promieniowania alfa. Szczegółowe omówienie i przegląd niskocząsteczkowych inhibitorów PSMA znakowanych różnymi emiterami promieniowania został szczegółowo przedstawiony, a zwłaszcza interesująca jest część dotycząca zastosowania nanocząstek jako nanonośników, wyznakowanych radionuklidem i skoniugowanym z jednostką targetową. Ostatnia część przeglądu literatury została poświęcona badaniom nad możliwościami immobilizacji jonów radu z uwzględnieniem chelatorów, liposomów, nanocząstek, zeolitów, a także nanozeolitów. Przegląd literatury jest doskonale napisany, uwzględnia najnowsze badania oraz zawiera bardzo dużo informacji podstawowych. Można się zastanawiać czy nie nazbyt wiele jest encyklopedycznych treści, które nie były konieczne w tego rodzaju rozprawie naukowej,

jednak ostateczny zakres i konstrukcja tego rozdziału, zdaniem recenzenta, jest właściwa i interesująca.

Cel pracy jest dobrze, jasno i zwięźle sformułowany, jakkolwiek cele szczegółowe stanowią raczej zakres pracy. Ponadto, zabrakło hipotezy, którą Autorka mogłaby postawić na zakończenie przeglądu literatury a przed celem pracy.

Materiał i metody. Stosowane w doświadczeniach materiały oraz zastosowane metody analityczno-badawcze zostały opisane w sposób niezwykle precyzyjny i staranny. Na uwagę zasługuje fakt, że Autorka zmodyfikowała i dostosowała do warunków doświadczeń niektóre standardowe procesy, co niewątpliwie świadczy o Jej wiedzy, doświadczeniu i dużej sprawności analitycznej. Optymalizacja syntezy nanocząstek zeolitowych typu NaA jest znaczącym osiągnięciem Kandydatki z zakresu metodologii badań. Bardzo starannie przygotowano również opis procesu przyłączania przeciwciał monoklonalnych anti-PSMAD2B do koniugatu NaA-silan-PEG-NH₂ i ²²³RaA-silan-PEG-NH₂ a także oceny ich stabilności, wielkości, polidispersyjności, koncentracji, stopnia agregacji. Ocena jakości nanozeolitów została dokonana w szerokim zakresie, między innymi z zastosowaniem XRD (dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego), rentgenowskiej spektroskopii EDS, spektroskopii w podczerwieni FTIR.

Autorka prowadziła swoje badania metodą *in vitro* z uwzględnieniem 3 linii komórkowych; dwu linii komórek nowotworowych prostaty DU145 i LNCaP C4-2 oraz jednej linii komórek prawidłowych prostaty RWPE-1. Należy podkreślić, że linie komórkowe zostały bardzo dobrze dobrane, dwie linie nowotworowe wykazywały przeciwnie wysoką ekspresję i brak ekspresji receptora PSMA. Do dwu linii nowotworowych dobrano trzecią linię – prawidłową, komórek epitelialnych, pochodzących z prostaty. Obraz morfologiczny badanych komórek, zamieszczony w tej części pracy, jest doskonałą ilustracją, jednak byłoby lepiej gdyby zamieszczono własne zdjęcia z naniesioną podziałką lub informacją o powiększeniu. W przedstawionej pracy badano odpowiedź biologiczną komórek na zastosowane koniugaty transporterowe dla ²²³Ra - NaA-silan-PEG-NH₂ i NaA-silan-PEG-D2B. Zastosowano tradycyjny test cytotoksyczności MTT metodą spektrofotometryczną, test aktywności apoptozy/nekrozy z zastosowaniem cytometrii przepływowej, analizę ekspresji genów *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPLPO* na poziomie mRNA metodą RT-PCR. Wydaje się, że badanie toksyczności mogło być potwierdzone drugą metodą chociażby testem LDH, testem BrDU czy też barwieniem Trypanem Blue. Przede wszystkim jednak, na uwagę zasługuje analiza skuteczności terapeutycznej nanocząstek zeolitowych NaA funkcjonalizowanych przeciwciałem anti-PSMA D2B i znakowanych radionuklidem ²²³Ra jako emitera promieniowania alfa z zastosowaniem znacznika izotopowego ¹³¹I, który umożliwił detekcję radiometryczną przeciwciał. Badano stopień wiązania radiobiokoniugatu do receptorów PSMA utrzymywanych komórek, jego internalizację przez komórki oraz radiotoksyczność (test MTT). Z uwagi na istotność badania radiotoksyczności można mieć wątpliwość co do braku powtórzenia badania za pomocą innego testu co nadmieniałam powyżej.

Podsumowując ten niezwykle istotny rozdział pracy, zgodnie z założeniem dysertacji naukowych, że materiał i metody powinny być przedstawione w sposób umożliwiający precyzyjne powtórzenie doświadczenia, niewątpliwie przedstawiony opis spełnia ten warunek.

Wyniki i dyskusja. Kolejnym rozdziałem przedstawionej mi do oceny dysertacji doktorskiej są wyniki i dyskusja. Można mieć jednak pewną uwagę, która nie umniejsza wartości naukowej pracy ale pozwoliłaby na bardziej czytelny wizerunek dysertacji, a mianowicie w pracy brakuje prostego schematu całości przeprowadzonych badań / doświadczeń, rodzaju graficznej syntezy układu doświadczeń i zmieniających się czynników doświadczalnych.

Rozdział wyniki i dyskusja podzielono logicznie na dwie części, pierwszą dotyczącą syntezy radiobiokoniugatu RaA-silan-PEG-D2B opartego na nanocząstkach zeolitowych typu NaA i drugą z zakresu biologicznej odpowiedzi komórek na zastosowanie badanych związków. Część pierwsza (podrozdział 4.1) jest doskonale przedstawiona. Wyniki zaprezentowano w formie wykresów, rysunków i tabel oraz opisano w sposób bardzo dojrzały, dowodzący doskonałej znajomości tematu przez Autorkę. Wyniki zostały przedyskutowane z danymi, zaczerpniętymi z badań innych autorów, a co najważniejsze opatrzone własną interpretacją i hipotezami. Autorka wykazała dużą dojrzałość w analizowaniu wyników badań, krytycznym podejściu do ich interpretacji i podejmowaniu kolejnych decyzji, korygujących potencjalne nieścisłości. Dbłość o wiarygodność wyników, która przejawiała się na przykład w przeprowadzeniu badania średnicy hydrodynamicznej czy potencjału zeta badanych związków w mediach stosowanych do kultur komórkowych, a nie w wodzie co jest najczęściej praktykowane, jest na najwyższym poziomie. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że przeprowadzone badania nad optymalizacją syntezy radiobiokoniugatu ^{223}RaA -silan-PEG-D2B posłużyły do stworzenia preparatu, który został włączony do badań przedklinicznych *in vitro* i *in vivo*. Tak więc jednym z kluczowych wyników przedstawionych badań jest opracowanie nowatorskiej procedury syntezy nanocząstek zeolitowych typu NaA.

W drugiej części rozdziału wyniki i dyskusja Autorka opisuje rezultaty badań dotyczących potencjalnej toksyczności i skuteczności terapeutycznej koniugatów. Niektóre nanocząstki, z uwagi na unikalne cechy fizyko-chemiczne, mają doskonałe predyspozycje do stanowienia nośnika dla substancji zarówno leczniczej jak też diagnostycznej pod warunkiem biogodności i braku toksyczności. A zatem Kandydatka przeprowadziła serię badań zmierzających do oceny toksyczności i efektywności terapeutycznej koniugatów z zastosowaniem kultur komórkowych dwu linii nowotworowych i jednej nie nowotworowej prostaty. Ocena przeprowadzona według schematu typu dose response wykazała brak toksyczności badanych koniugatów NaA-silan-PEG-NH₂ i NaA-silan-PEG-D2B na poziomie do 100 ug/ml wobec komórek nowotworowych i do 50 ug/ml wobec komórek nie nowotworowych. Ten ważny wynik stał się podstawą do kolejnych badań aktywności biologicznej koniugatów. Nie mniej, ocena indukcji apoptozy / nekrozy metodą cytometryczną również udokumentowała istotną biogodność badanych koniugatów. Co więcej wynik ten potwierdzono analizą

aktywności kaspaz 3/7. Ostatecznym potwierdzeniem dużej biozgodności koniugatów była analiza ekspresji 84 genów zaangażowanych w procesy stanu zapalnego. Jakkolwiek Autorka obserwowała zwiększenie ekspresji kilku genów zaangażowanych w indukcję reakcji zapalnej, jednak w dalszej dyskusji odniosła się do istoty tej obserwacji. Należy również wziąć pod uwagę fakt, że analiza ekspresji genów na poziomie mRNA bez analizy ekspresji genów na poziomie białka może być niemiarodajna. W ostatecznej dyskusji i ocenie Autorka uznała badane nośniki za biozgodne, co wydaje się słuszne.

Najbardziej interesujące wyniki dotyczą oceny wiązania radiobiokoniugatu do receptorów PSMA z zastosowaniem znacznika izotopowego ^{131}I oraz radiotoksyczności badanego związku. Kandydatka potwierdziła specyficzność wiązania radiobiokoniugatu do receptora PSMA komórek LNCaP C4-2 i konsekwentnie brak tego wiązania do komórek DU145 (brak ekspresji receptora PSMW. Najważniejszym wynikiem uzyskanym przez kandydatkę było określenie radiotoksyczności radiobiokoniugatu ^{223}RaA -silan-PEG-D2B. Badania *in vitro* przeprowadzono również na dwu liniach komórkowych (z ekspresją PSMA vs. bez ekspresji PSMA). Wyniki badań Kandydatki wykazały wyraźnie skuteczność radiobiokoniugatu, emitującego promieniowanie alfa, w niszczeniu komórek zarówno LNCaP C4-2 jak też DU145, chociaż specyficzność wiązania tego koniugatu do receptora PSMA i jego internalizacja zadecydowały o znacznie większej radiotoksyczności wobec komórek LNCaP C4-2. Ten interesujący i nowatorski wynik stanowi o dużej randze naukowej przedstawionej dysertacji doktorskiej. Jakkolwiek nasuwają się pewne wątpliwości dotyczące braku potwierdzenia skuteczności radiotoksyczności radiobiokoniugatu za pomocą innego testu toksyczności / przeżywalności *in vitro* a także pytanie dlaczego doświadczenia nie przeprowadzono również na komórkach prawidłowych co byłoby interesujące z punktu widzenia tzw. „side effects”.

Podsumowując, jednak należy stwierdzić, że szeroki zakres dyskusji, a jednocześnie utrzymanie porządku prowadzonej myśli przewodniej dyskusji wydaje się wyróżniająca. Można pogratulować Kandydatce tych umiejętności, cechujących zazwyczaj doświadczonych autorów prac naukowych. Co więcej wydaje się, że wskazówki promotorów pracy były przez kandydatkę doskonale wykorzystane.

Wnioski. Badania, przeprowadzone przez Autorkę pozwoli na opracowanie licznych wniosków. Wnioski są doskonale sprecyzowane, co nie jest łatwym zadaniem podczas opracowywania tak obszernego materiału. Wnioski wyeksponowały wartość przeprowadzonych badań, ich nowatorski charakter, uzyskanie wielu cennych wyników, a także nie tylko naukowy, ale również aplikacyjny charakter przeprowadzonych doświadczeń. Z pewnością wyniki badań posłużą jako bezcenny materiał podczas kolejnych doświadczeń, zmierzających do stworzenia radiofarmaceutyków do stosowania w terapii onkologicznej.

Podsumowanie recenzji

Tematyka, jaką podjęła Kandydatka jest nowatorska, a taka praca badawcza niesie ze sobą duży pierwiastek trudności, nie tylko dotyczący interpretacji uzyskanych

wyników, lecz przede wszystkim metodycznej strony podjętych badań. Pomimo kilku pytań i nielicznych wątpliwości recenzenta badania przeprowadzone przez Panią mgr Malwinę Czerwińską, a także ich opracowanie, przedyskutowanie i podsumowanie oceniam bardzo wysoko. Badania, bez wątpienia będą miały wpływ na rozwój dyscypliny i wpłyną na postęp w dziedzinie bezpieczeństwa i skuteczności radioterapii nowotworów. Praca oparta jest na cyklu publikacji, recenzowanych i opublikowanych w prestiżowych i bardzo dobrych czasopismach, co stanowi gwarancję ich merytorycznej wartości.

W konkluzji recenzji stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska **mgr Malwiny Czerwińskiej „Nanozeolit NaA funkcjonalizowany przeciwciałem anti-PSMA i znakowany radionuklidem ^{223}Ra jako potencjalny radiofarmaceutyk dla celowanej terapii raka stercza”** odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki i może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora w postępowaniu prowadzonym na podstawie Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (dz. U. z 2017 r. poz 1789 ze zm.), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – przepisy wprowadzające Ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2017 r. poz 1789 ze zm. w Dz. U. z 22 marca 2019 r. poz. 534. Dlatego też, przedstawiam Wysokiej Radzie Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej wnioszek o dopuszczenie mgr Malwiny Czerwińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę również o wyróżnienie pracy doktorskiej, z uwagi na bardzo wysoki poziom merytoryczny podjętych badań, a przede wszystkim ich nowatorski charakter.

Ewa Sawosz Chwalibóg, 20.09.2021

