

Dr hab. inż. Renata Mikołajczak

12.09.2018 r

Ośrodek Radioizotopów POLATOM

Narodowe Centrum Badań Jądrowych

ul. Andrzeja Sołtana 7

05-400 Otwock

Recenzja rozprawy doktorskiej
pt. „Biokoniugaty nanocząstek złota jako nośniki ^{211}At
w celowanej alfa terapii”

mgr Łucji Dziawer
z Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej

Promotor: prof. dr hab. Aleksander Bilewicz
Promotor pomocniczy: dr inż. Agnieszka Majkowska-Pilip

Ocena merytoryczna pracy

Po znaczącym wzroście zastosowań terapeutycznych radionuklidów emitujących promieniowanie β^- , który obserwowaliśmy w ostatnich dekadach, obecnie zainteresowanie klinicystów kieruje się na podobne zastosowania lecznicze emiterów promieniowania α . Charakteryzują się one wyższą energią promieniowania i krótszym zasięgiem (poniżej 1 mm) w tkankach. Jego działanie na komórki nowotworowe jest też bardziej skuteczne – powoduje ono uszkodzenia dwuniciowe DNA. Promieniowanie powoduje martwicę lub prowadzi do zjawiska apoptozy. Jeśli nawet komórka nie zostanie zniszczona bezpośrednio po działaniu promieniowania, obserwuje się tzw. śmierć mitotyczną – martwicy ulegają komórki potomne w trakcie podziału komórkowego. Sposób uszkodzania DNA to jedna z ważniejszych różnic między promieniowaniem β^- i α . Selektowność działania promieniowania jest uzależniona przede wszystkim od stosowania działających coraz bardziej wybiórczo nośników.

Zwiększone zainteresowanie wykorzystaniem α -emiterów wynika z faktu, że dostępne są substancje chelatujące, tworzące trwałe kompleksy z niektórymi z nich, np. DOTA wykorzystywana w receptorowej peptydowej radioterapii wewnętrznej do wiązania ^{177}Lu czy ^{90}Y , wiąże również ^{213}Bi czy ^{225}Ac . Do rutynowej α -terapii wprowadzono w ostatnich latach preparat Xofigo (^{223}Ra). W radiofarmaceutyku tym ^{223}Ra w postaci chlorku jest podawany dożylnie i wychwytywany z krwioobiegu w komórkach kostnych, podobnie do jonów wapnia. Takiej strategii nie można jednak stosować w przypadku astatu-211, innego radionuklidu emitującego promieniowanie α . Astat jest najcięższym pierwiastkiem w grupie halogenków, wykazuje podobieństwo chemiczne do jodu, ma jednak bardziej metaliczny charakter niż jod. Właściwość tę wykorzystywano do tworzenia połączeń z węglem w związkach organicznych, jednakże połączenia te nie są trwałe. Możliwości radioterapii z zastosowaniem ^{211}At badano od dawna, pierwsze zastosowania ograniczały się do podania domiejscowego np. w leczeniu nowotworów skóry, ze względu na brak nośników, które zapewniałyby stabilne i swoiste dostarczenie izotopu w obręb nowotworu w podaniu dożylnym.

Mając na uwadze korzystny efekt leczniczy ^{211}At oraz możliwości wydajnego otrzymywania go w cyklotronach, Doktorantka słusznie kieruje swoją uwagę na wykorzystanie tego radionuklidu do radioterapii wewnętrznej. Ma przy tym dobrą ocenę ograniczeń, jakie stawia przed badaczem ten izotop promieniotwórczy, a w szczególności trudność w tworzeniu trwałych połączeń chemicznych astatu. Dlatego Doktorantka zwraca uwagę na różnego rodzaju nanocząstki jako potencjalne nośniki dla ^{211}At .

Temat rozprawy doktorskiej dotyczy zagadnienia trwałego wiązania radionuklidu ^{211}At z cząsteczkami aktywnymi biologicznie, które to trwałe połączenie zwiększałoby dostępność radiofarmaceutyków znakowanych ^{211}At w praktyce medycznej. Postawiona hipoteza badawcza zakładała możliwość wykorzystania nanocząstek złota jako nośnika dla ^{211}At , poprzez wiązanie astatu na powierzchni tych nanocząstek na zasadzie adsorpcji. Badania nad wykorzystaniem nanocząstek nieorganicznych do wiązania astatu-211 uważam za istotne, wnoszące ważny wkład w rozwój tej metody i jej potencjalne przyszłe zastosowania.

Tezy rozprawy można pokrótce scharakteryzować następująco:

- zbadanie możliwości wiązania astatu-211 na wytypowanych i zsyntezowanych przez doktorantkę nanocząstkach metali tj. telluru osadzonego na tlenku tytanu (TeTiO_2), platyny osadzonej na tlenku tytanu (PtTiO_2), platyny, nanocząstki typu rdzeń/powłoka zbudowane z rdzenia Au_2S i otoczki Au ($\text{Au}_2\text{S}/\text{AuNPs}$) oraz nanocząstki złota o dwóch różnych wielkościach Au 5 nm i Au 15 nm,

- wyznakowanie nanocząstek astatem-211 oraz określenie ich stabilności w roztworach metodami radiochemicznymi,
- modyfikacja powierzchni nanocząstek AuNPs w celu przyłączenia cząsteczek aktywnych biologicznie, naprowadzających na wybrany rodzaj nowotworu,
- otrzymanie radiobiokoniugatów nanocząstek AuNPs i cząsteczek naprowadzających tj. substancji P(5-11), peptydu wiążącego się swoiście z receptorami NK1, występującymi ze zwiększoną częstością na komórkach glejaka wielopostaciowego oraz przeciwciała monoklonalnego trastuzumab, wykazującego powinowactwo do receptorów HER2, których ekspresja towarzyszy często nowotworom raka piersi i jajnika,
- ocena cytotoksyczności i powinowactwa receptorowego otrzymanych radiobiokoniugatów metodami in vitro na wybranych liniach komórkowych.

Takie sformułowanie koncepcji badawczej uważam za trafne i logiczne.

Praca przedstawiona do oceny powstała dzięki możliwości wykorzystania urządzeń i przeprowadzenia doświadczeń w kilku ośrodkach, w tym w jednostce macierzystej Doktorantki, Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, w Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego (CMKP) w Warszawie, natomiast astat-211 wytwarzany był w Środowiskowym Laboratorium Ciężkich Jonów Uniwersytetu Warszawskiego.

Recenzowana rozprawa napisana jest w sposób klasyczny i składa się z przeglądu literaturowego, części eksperymentalnej, wyników z dyskusją, podsumowania i wniosków. Zawiera 167 cytowanych pozycji, z tej liczby 153 pozycje w części literaturowej i dalsze 14 w części eksperymentalnej. Cytowane pozycje są aktualne, większość z ostatnich 10 lat. Zakres tematyczny wyboru literaturowego jest bardzo szeroki i wszechstronnie przedstawia badane zagadnienie. W części literaturowej Doktorantka omawia podstawy radiofarmacji i ogólnie charakteryzuje radiofarmaceutyki znajdujące zastosowanie w diagnostyce i leczeniu różnych schorzeń. Następnie omawia bardziej szczegółowo radiofarmaceutyki oparte na emiterach promieniowania alfa oraz przedstawia znaczenie radiounklidu ^{211}At w celowanej radioterapii nowotworowej. Charakteryzuje właściwości jądrowe ^{211}At , jego schemat rozpadu i charakter emisji, możliwości jego otrzymywania oraz zalety i ograniczenia wynikające z charakterystyki fizycznej i chemicznej ^{211}At i jego produktów rozpadu. Podobnej analizy Doktorantka dokonała w odniesieniu do nanocząstek jako nośników leku i ich zastosowań medycznych. Na szczególną uwagę zasługuje tu omówienie szczegółowo mechanizmów kumulowania się nanocząstek w

tkankach i potencjalnych korzyści z zastosowania naprowadzających wektorów biologicznych do zwiększenia skuteczności celowanej radioterapii wewnętrznej. Przeprowadzona analiza źródeł jest obszerna, a sformułowane na jej podstawie wnioski – poprawne. Dobrze uzasadniają cel pracy, który Doktorantka konsekwentnie realizuje w części eksperymentalnej. Dodatkowo, materiał ten jest zilustrowany graficznie, dając czytelnikowi łatwy wgląd w istotę zagadnienia.

Część eksperymentalna spełnia oczekiwania wobec prac doświadczalnych, wykonywanych z zastosowaniem licznej nowoczesnej aparatury pomiarowej i metod analitycznych. Doktorantka przyjęła założenie, że nieorganiczne nanocząstki mogą skutecznie wiązać ^{211}At ponieważ znane są takie oddziaływania dla jodu a potencjał adsorbcyjny Au-At jest wysoki. Rzeczywiście, spośród badanych nanocząstek nieorganicznych, nanocząstki złota AuNPs najbardziej wydajnie i trwale wiązały ^{211}At . AuNPs wykazywały również jednorodność kształtu i rozmiaru, co Doktorantka potwierdziła technikami TEM i DLS. Następnie dokonała modyfikacji ich powierzchni metodą pegylacji. Dobrała stopień pokrycia powierzchni tak, aby zachować ich zdolność do adsorpcji astatu, oraz przyłączyła do nich wytypowane wektory biologiczne. Badania na liniach komórkowych wykazały swoiste wiązanie wyznakowanych ^{211}At radiobiokoniugatów na membranach komórkowych, wskazując na receptorowy charakter tego wiązania. Na uwagę zasługuje zastosowanie mikroskopii konfokalnej w celu zobrazowania wiązania biokoniugatu AuNPs-S-PEGIgG1 z receptorem HER2 oraz internalizacji do komórek nowotworowych, a także zobrazowanie nanocząstek złota 15 nm oraz biokoniugatu za pomocą mikroskopii ciemnego pola. Uzyskane obrazy wskazują na przechodzenie biokoniugatu przez błonę komórkową, co jest efektem spodziewanym mając na uwadze wyniki badań internalizacji. Natomiast rozważania co do ich gromadzenia się w jądrze komórkowym mają raczej charakter spekulatywny, nie poparty wynikami innych badań. Szkoda, że Doktorantka nie podejmuje próby wyjaśnienia tej obserwacji. Natomiast za przejaw dociekliwości naukowej Doktorantki należy uznać próbę włączenia metod obliczeniowych do wyjaśnienia mechanizmu tworzenia silnego wiązania Au-At adsorbpcji astatu na złocie.

Doktorantka podsumowuje pracę na etapie badań in vitro. Niewątpliwie badania w kierunku sprawdzenia, czy poza zastosowaniem domiejscowym, przyjęta strategia mogłaby doprowadzić do otrzymania nanocząsteczek wykazujących selektywne gromadzenie w komórkach nowotworowych w warunkach in vivo, warte są kontynuacji.

Część dotycząca wyników i dyskusji rozprawy jest przedstawiona wyczerpująco i merytorycznie, zajmuje ponad 30 stron. Wskazuje na doświadczenie Doktorantki w pracy

laboratoryjnej, opanowanie warsztatu badawczego, umiejętność wyboru i zastosowanie wielu metod syntezy nieorganicznej, metodyki znakowania izotopowego, analizy chemicznej i badań in vitro, w tym zastosowanie techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS), transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) i chromatografii cienkowarstwowej (TLC) i technik mikroskopowych.

Pewien niedosyt pozostawia fakt, że wyniki badań połączono z ich dyskusją i to wyniki badań są dominującą częścią tego rozdziału a odniesienia do piśmiennictwa cytowanego w pracy są nieliczne.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy ogółem 91 stron, rozpisanych na 10 rozdziałów, 10 tabel i 23 rysunki. Zasadniczą część rozprawy stanowi rozdział 9, w którym Doktorantka przedstawia uzyskane wyniki i dokonuje ich krytycznej oceny, w konsekwencji prowadzącej do wniosków opisanych w rozdziale 10. Stwierdzam, że rozwiązanie postawionego zadania zostało przeprowadzone prawidłowo, a przyjęte założenia i metody nie budzą większych zastrzeżeń. Na uwagę zasługuje zakres i sposób posługiwania się szeregiem metod instrumentalnych i analitycznych, co świadczy o wiedzy Doktorantki w tym zakresie.

W efekcie pracy powstała publikacja, w której Doktorantka jest pierwszym autorem: **L. Dziawer**, P. Koźmiński, S. Męczyńska-Wielgosz, M. Pruszyński, M. Łyczko, B. Wąs, G. Celichowski, J. Grobelny, J. Jastrzębski, A. Bilewicz, Gold nanoparticle bioconjugates labelled with ^{211}At for targeted alpha therapy, RSC Adv., 2017, 7, 41024. Publikacja ta prezentuje zasadnicze osiągnięcia Doktorantki, nie jest jednak w rozprawie cytowana. Podobnie jeśli chodzi o zgłoszenie patentowe Nr P. 411258 "Radiofarmaceutyk terapeutyczny oparty na znakowanych astatem-211 nanocząstkach złota oraz sposób jego wytwarzania". Zgłoszenie to można znaleźć w dorobku Autorki ale nie jest cytowane w jej pracy doktorskiej. Wskazanie powyższych źródeł w tekście rozprawy ułatwiłoby zidentyfikowanie, jaki jest rzeczywisty efekt praktyczny osiągnięć Doktorantki przedstawionych w jej dysertacji.

Oceniając dorobek publikacyjny Doktorantki należy zauważyć, że jest ona pierwszym autorem w jednej publikacji w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, oraz współautorem w publikacji krajowej (punktowanej przez MNiSW), przygotowanie kolejnej publikacji zawierającej wyniki badań doktorantki jest deklaruwane. Doktorantka jest również pierwszym autorem w zgłoszeniu patentowym złożonym w Polskim Urzędzie Patentowym. Na podkreślenie zasługuje

nagrodzenie przedmiotu zgłoszenia medalem platynowym na X Międzynarodowej Warszawskiej Wystawie Wynalazków IWIS 2016.

Praca została zredagowana starannie, błędy edytorskie w zasadzie się nie zdarzają. Jedynie drobne zastrzeżenia można mieć do interpunkcji, przecinki stosowane są w nadmiarze. Natomiast Doktorantka nie ustrzegła się pewnych nieścisłości w przywoływaniu danych fizycznych opisywanych radionuklidów, np. okres półtrwania astatu-211 podany w Tabeli 2 na stronie 10 wynosi 7 h, na stronie 15 podano, że wynosi 7,2 h a na stronie 38, że wynosi 7,22 h. Zazwyczaj zaleca się, żeby w rozprawach naukowych powoływać się spójnie na jedno źródło danych fizycznych, żeby uniknąć podobnych rozbieżności.

Pracę doktorską mgr Łucji Dziawer pt. „Biokoniugaty nanocząstek złota jako nośniki ^{211}At w celowanej alfa terapii” oceniam wysoko. Praca spełnia wymogi stawiane przez ustawodawcę pracom doktorskim. Pewne drobne manakmenty, budzące moje zastrzeżenia, nie wpływają na ogólną ocenę pracy, na wyciągnięte wnioski i nie umniejszają znaczenia przedstawionych wyników. Uważam, że Doktorantka jest w pełni dojrzałą kandydatką do organizowania i prowadzenia badań naukowych, spełnia tym samym kryteria stawiane pracownikom naukowym ubiegającym się o stopień naukowy doktora.

Podsumowując, oceniam przedstawioną rozprawę doktorską jako bardzo dobrą, spełniającą wymagania ustawy dotyczące rozpraw doktorskich i wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Łucji Dziawer do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. inż. Renata Mikołajczak

Świerk-Otwock: 18.09.2018

**Rada Naukowa
Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16
03-195 Warszawa**

Szanowni Państwo!


Niniejszym przekazuję recenzję rozprawy doktorskiej Pani mgr Łucji Dziawer pt. „Biokoniugaty nanocząstek złota jako nośniki ^{211}At w celowanej alfa terapii”, której promotorem jest Pan prof. dr hab. Aleksander Bilewicz a promotorem pomocniczym jest Pani dr inż. Agnieszka Majkowska-Pilip.

Zapoznałam się z pracą z zainteresowaniem i oceniam jej poziom jako wyróżniający. Zwracam się więc do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej o wyróżnienie rozprawy.

Praca prezentuje wysoki poziom, zasługujący na wyróżnienie, biorąc pod uwagę rangę rozwiązywanego problemu jakim jest wykorzystanie nanocząstek do związania astatu-211. Z tej perspektywy badania przedstawione w pracy wnoszą ważny wkład w rozwój tej metody i jej potencjalne przyszłe zastosowania.

Praca została przygotowana bardzo poprawnie formalnie i i językowo, wyniki przedstawione zostały z dużą starannością, wskazują na sumienność i dociekliwość Doktorantki. Stanowi ważny wkład w rozwój nowoczesnych zastosowań radionuklidów alfa-promieniotwórczych do celów medycznych.

Z wyrazami szacunku



Dr hab. inż. Renata Mikołajczak

Ośrodek Radioizotopów POLATOM
Narodowe Centrum Badań Jądrowych