



Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Katedra Chemii i Biochemii Medycznej
Zakład Chemii Biomolekularnej

ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; tel. 42-2725706; e-mail anna.janecka@umed.lodz.pl

Prof. dr hab. n. med. Anna Janecka

Łódź, dn. 5 maja 2021 r.

OCENA
pracy doktorskiej mgr Weroniki Gawędy
pt. „Biokoniugaty ferrytu barowego jako nośniki ^{223}Ra w α -radioimmunoterapii”
wykonanej w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej Centrum Radiochemii i Chemii
Jądrowej w Warszawie
pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra Bilewicza

W terapii chorób nowotworowych obok metod chirurgicznych, chemioterapia i naświetlania są powszechnie stosowane pomimo związanych z nimi, często poważnych, działań niepożądanych. Nowa strategia terapeutyczna nazwana celowaną terapią radionuklidową polega na wybiórczym niszczeniu przez odpowiedni promieniotwórczy izotop przyłączony do biologicznie aktywnej cząsteczki komórek nowotworowych, oszczędzając komórki zdrowe.

Radiofarmaceutyk składa się z radionuklidu, związku który go kompleksuje i wektora, biologicznie czynnej cząsteczki, posiadającej powinowactwo do receptorów wykazujących nadekspresję na powierzchni komórek nowotworowych. Dobór odpowiednich elementów składowych radiofarmaceutyku jest zadaniem bardzo złożonym.

W ten ważny nurt poszukiwań odpowiednich nośników do zastosowania w terapii celowanej z użyciem radionuklidów będących emiterami cząstek α wpisuje się tematyka pracy doktorskiej mgr Weroniki Gawędy, wykonana w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej Centrum Radiochemii i Chemii Jądrowej w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra Bilewicza, który od lat zajmuje się tematyką związaną z otrzymywaniem nowych radiofarmaceutyków.

Spośród wielu radioaktywnych izotopów emitujących cząstki α Doktorantka wybrała do swoich badań ^{223}Ra , który ma optymalny dla celów terapeutycznych okres półtrwania (około 11 dni), dużą skuteczność działania i może być stosunkowo łatwo otrzymany z ^{227}Ac . Problemem z użyciem tego radionuklidu jest znalezienie stabilnego nośnika, trwale go wiążącego. Jak dotąd brak jest ligandów, które dawałyby stabilne kompleksy z kationem Ra^{2+} i dlatego podejmowane były próby, również w grupie profesora Bilewicza, włączania $^{223}\text{Ra}^{2+}$ w strukturę nanocząstek.

Głównym celem recenzowanej pracy doktorskiej było otrzymanie nanocząstek o rozmiarach poniżej 100 nm, z wbudowanym izotopem ^{223}Ra . Mgr Gawęda zaproponowała

jako nośnik dla $^{223}\text{Ra}^{2+}$ nanocząstki ferrytu barowego, kierując się podobieństwem promieni jonowych oraz właściwości chemicznych kationów Ba^{2+} i Ra^{2+} . Aby uzyskać nanocząstki o zakładanych rozmiarach Doktorantka zastosowała do ich syntezy metodę hydrotermalną z wykorzystaniem reaktora wysokociśnieniowego. Parametry syntezy, takie jak czas, szybkość mieszania oraz stosunek $\text{Fe}^{3+}/\text{Ba}^{2+}$ były zmieniane w celu zaproponowania najlepszych warunków, a otrzymane produkty były analizowane za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Przeprowadzone próby pozwoliły na wybranie optymalnych warunków syntezy ferrytu barowego, która była prowadzona przez 6.5 h w temperaturze 210°C , mieszaniu 750 rpm i stosunku $\text{Fe}^{3+}/\text{Ba}^{2+}$ 8/1. Otrzymane nanocząstki zostały następnie przez Doktorantkę scharakteryzowane pod kątem ich właściwości magnetycznych, wielkości i kształtu oraz składu pierwiastkowego, co zostało ładnie zilustrowane odpowiednimi zdjęciami.

Kolejnym celem było wyznaczenie otrzymanych nanocząstek radioaktywnym izotopem ^{223}Ra . Można to osiągnąć albo poprzez adsorpcję radionuklidu na powierzchni nanocząstek, albo poprzez jego wbudowanie do struktury nanocząstki. Mgr Gawęda wybrała to drugie rozwiązanie, pozwalające uzyskać silniejsze związanie radu niż absorpcja powierzchniowa. W opisie znakowania brakuje mi danych dotyczących pochodzenia radioaktywnego RaCl_2 .

Aby otrzymać potencjalny radiofarmaceutyk, mgr Gawęda postawiła sobie za zadanie połączenie znakowanego radem ferrytu barowego z trastuzumabem, który jest rekombinowanym przeciwciałem monoklonalnym, łączącym się wybiórczo z receptorem ludzkiego czynnika wzrostu naskórka 2. Jako linker zastosowany został kwas 3-fosfonopropionowy. Szkoda, że w tekście nie został umieszczony skrót CEPA, który widnieje na rysunku 10. Dalej Doktorantka pisze, że grupa fosfonianowa, niewłaściwie określona wzorem $-\text{PO}_3$ zamiast $-\text{PO}_3\text{H}_2$, pochodząca z kwasu 3-fosfonopropionowego ma powinowactwo do grup $-\text{OH}$ w cząsteczce ferrytu barowego. Czy oznacza to, że tworzy z nimi wiązania estrowe, czy może wodorowe - nie jest to jasno powiedziane. Grupa karboksylowa kwasu 3-fosfonopropionowego daje aktywny ester z N-hydroksylsulfosukcynimidem, który następnie reaguje z grupami aminowymi na powierzchni przeciwciała, łącząc wiązaniem amidowym przeciwciało z linkerem. Otrzymany biokoniugat został scharakteryzowany przy użyciu szeregu metod fizykochemicznych, co potwierdziło poprawność jego syntezy.

Następnie, przy zastosowaniu dwóch różnych metod Doktorantka oszacowała liczbę cząsteczek trastuzumabu przyłączonych do pojedynczej nanocząstki i po porównaniu otrzymanych wyników zdecydowała do dalszych badań używać $250\ \mu\text{g}$ trastuzumabu na $1\ \text{mg}$ nanocząstek.

Stabilność otrzymanego biokoniugatu i jego fragmentów mgr Gawęda badała pod kątem retencji radu w kilku roztworach, mierząc poziom radioaktywności przy użyciu spektrometru gamma w całym roztworze, a następnie w supernatancie otrzymanym po usunięciu biokoniugatu. Do tego fragmentu pracy mam 2 pytania. Doktorantka pisze na str. 47, że "procent stabilności został wyznaczony jako stosunek aktywności zmierzonej w supernatancie do aktywności całej próbki" -chyba powinno być odwrotnie? Drugie moje pytanie dotyczy rysunków 15-17, przedstawiających wyniki badań stabilności w różnych roztworach. Z jakiego powodu Rys. 15 ma inną formę niż 16 i 17? Retencja ^{223}Ra w biokoniugacie okazała się wysoka, powyżej 90%.

Podsumowując tę część pracy można powiedzieć, że Doktorantce udało się otrzymać biokoniugat znakowany izotopem ^{223}Ra , spełniający podstawowe wymagania stawiane radiofarmaceutynom, takie jak stosunkowo łatwa synteza i duża stabilność.

Druga część pracy dotyczyła badań biologicznych *in vitro* otrzymanego biokoniugatu. Doktorantka przeprowadziła badania powinowactwa do receptora HER2 na linii komórkowej SKOV-3 z nadekspresją tego receptora i dla porównania na linii MDA-MB-231 bez nadekspresji HER2. Wyniki tych badań są przedstawione na Rys. 18 i 19. Czego brakuje mi w tych badaniach to analizy statystycznej otrzymanych wyników, która pokazałaby, czy otrzymane wyniki są istotne statystycznie.

Na linii SKOV-3(HER2+) zostało też przeprowadzone badanie internalizacji biokoniugatu metodą radiometryczną. Doktorantka wykazała, że badany biokoniugat był szybko internalizowany i zatrzymywany wewnątrz komórki. Wynik ten został potwierdzony na drodze mikroskopii konfokalnej. W tym przypadku zamiast radioaktywnego związku użyty był biokoniugat zawierający jony Ba zamiast Ra (BaFe12O19-CEPA-trastuzumab). Zdjęcia z mikroskopu kofokalnego wyraźnie pokazują akumulację biokoniugatu w komórkach z nadekspresją receptora HER2.

Ostatnim elementem pracy było badanie cytotoksyczności otrzymanych związków na linii SKOV-3 metodą MTS w zależności od stężenia związku "zimnego" lub dawki związku radioaktywnego oraz od czasu. Mgr Gawęda wykazała, że nieradioaktywne składowe biokoniugatu nie były toksyczne dla komórek, natomiast radioaktywny koniugat powodował znaczny efekt cytotoksyczny. Autorka porównała też otrzymane dla jej biokoniugatu wartości LD_{50} z wartościami znanymi z literatury, otrzymanymi dla biokoniugatów trastuzumabu z innymi radionuklidami i linkerami, dyskutując obserwowane różnice. W kolejnym eksperymencie Doktorantka zbadała też wpływ biokoniugatu na klastry komórek SKOV-3, co pozwala na lepszą ocenę działania preparatu niż ma to miejsce w monowarstwie. Wzrost klastrow był hamowany przez biokoniugat (ale nie przez wolny radioaktywny ^{223}Ra), wprost proporcjonalnie do użytej dawki promieniowania. W tym miejscu chciałabym zapytać jaka jest różnica pomiędzy wartością LD_{50} wyliczoną w pracy, a IC_{50} , która jest zwykle stosowana do opisywania wyników testu na cytotoksyczność (MTT lub MTS).

Podsumowując, badania *in vitro* wykazały duże powinowactwo otrzymanego w pracy biokoniugatu do receptorów HER2, jego szybką internalizację i akumulację w komórkach nowotworowych oraz dużą cytotoksyczność zarówno do komórek hodowanych w monowarstwie jak i do klastrow komórek.

Część eksperymentalną rozprawy kończy przedstawione w punktach podsumowanie otrzymanych wyników oraz krótkie omówienie pokazujące dobre i złe strony otrzymanego biokoniugatu jako potencjalnego radiofarmaceutyku, które uważam za cenne.

Oceniana rozprawa mgr Gawędy ma 113 stron. Rozpoczyna ją streszczenie w języku polskim i angielskim. Wykaz skrótów umieszczony na początku powinien być przedstawiony w kolejności alfabetycznej. Obszerna, 38 stronicowa część literaturowa oparta na 170 pozycjach piśmiennictwa wskazuje na dużą wiedzę Doktorantki dotyczącą tematyki związanej z radiofarmaceutykami. Mgr Gawęda przedstawia w niej rys historyczny dotyczący początków medycyny nuklearnej. Następnie opisane są różne zastosowania, zarówno

diagnostyczne jak i terapeutyczne, wykorzystujące promieniowanie jonizujące. Ponieważ głównym zainteresowaniem Doktorantki jest terapia celowana, dużo miejsca poświęcone jest charakterystyce cech dobrego radionuklidu oraz wyborowi nośnika i wektora. Kolejna część dotyczy nanocząstek w medycynie nuklearnej. Wybór zagadnień przedstawionych w części teoretycznej świadczy o właściwym zrozumieniu roli tej części dysertacji, stanowiącej wprowadzenie i uzasadnienie wybranego celu pracy. Część ta stanowi cenne źródło informacji naukowych.

Rozdział *Część doświadczalna* precyzuje szczegóły stosowanych technik badawczych i jest napisany w sposób przejrzysty i kompetentny. Kolejne, właściwie zaplanowane zadania badawcze są w pełni uzasadnione w świetle postawionego celu. Tematyka pracy jest obszerna i wymagała od Doktorantki opanowania szeregu technik syntetycznych prowadzących do modyfikacji powierzchni ferrytu barowego i przyłączenia przeciwciała oraz metod analitycznych, takich jak między innymi pomiary magnetometryczne, analiza termogravimetryczna, spektrofotometria UV-Vis, mikroskopia konfokalna i również badań na komórkach. Tak szeroki wachlarz badań eksperymentalnych zasługuje na podkreślenie. Praca przygotowana jest z dużą starannością i ilustrowana wykresami i zdjęciami.

Szkoda, że Doktorantka nie umieściła na końcu pracy spisu swoich publikacji, ani źródeł finansowania. W bazie PubMed znalazłam pracę opublikowaną w 2020 roku w *Nonomaterials*, w której mgr Gawęda jest pierwszym autorem, opisującą większość wyników przedstawionych w rozprawie. Opublikowanie pracy w czasopiśmie mającym współczynnik wpływu ponad 4 jest warte wspomnienia i potwierdza duże znaczenie otrzymanych wyników w rozwoju terapii celowanej.

Podsumowanie i wnioski:

W podsumowaniu stwierdzam, że w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej mgr Weronika Gawęda postawiła sobie ambitny cel, który konsekwentnie zrealizowała. Badania podjęte przez Doktorantkę są z punktu widzenia naukowego, a przede wszystkim aplikacyjnego wysoce aktualne. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością dziedziny, której dotyczy praca. Wyniki przedstawione w rozprawie w sposób istotny poszerzają wiedzę na temat możliwości otrzymywania i wykorzystania nowych radiofarmaceutyków w terapii celowanej nowotworów.

Opiniowana praca w pełni spełnia wymagania stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Dlatego z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie o dopuszczenie mgr Weroniki Gawędy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się z propozycją wyróżnienia rozprawy ze względu na otrzymanie bardzo wartościowych wyników, które stanowią cenny wkład w badania nad nowymi radiofarmaceutykami.

A. Gawęda