

Dr hab. Zygmunt Szefliński
Doktor habilitowany nauk fizycznych
Uniwersytet Warszawski
Środowiskowe Laboratorium Ciężkich Jonów
ul. Pasteura 5A, 02-093 Warszawa
e-mail: szef@fuw.edu.pl

Warszawa, 13 września 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Katarzyny Sylwii Masłowskiej

pt. „Synteza i badania radioznakowanych peptydomimetycznych inhibitorów kompleksu VEGF/NRP1 do diagnostyki patologicznej angiogenezy”

1. Wartość naukowa rozprawy

a. Oryginalność badań

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Masłowskiej pt. „Synteza i badania radioznakowanych peptydomimetycznych inhibitorów kompleksu VEGF/NRP1 do diagnostyki patologicznej angiogenezy” została wykonana w IChTJ we współpracy z Zakładem Neuropeptydów Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN oraz Pracownią Peptydów Wydziału Chemii UW pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Gniazdowskiej z IChTJ i prof. dr hab. Aleksandry Misickiej-Kęsik z Wydziału Chemii UW.

Podjęta przez doktorantkę problematyka badawcza koncentruje się wokół zagadnień związanych z poszukiwaniem radiofarmaceutyków diagnostycznych i terapeutycznych, które z jednej strony mogłyby zdiagnozować ogniska patologicznej angiogenezy nowotworowej lub jako radiofarmaceutyki terapeutyczne selektywne i specyficzne względem molekularnego celu, napromieniać zmianę nowotworową nie niszcząc zdrowych komórek i organów. Autorka rozprawy zauważyła, że kompleks VEGF-A₁₆₅/VEGFR-2/NRP-1 jest zaangażowany w proces patologicznej angiogenezy nowotworowej, a zatem należy poszukiwać radiofarmaceutyków receptorowych opartych na inhibitorach kompleksu VEGF-A₁₆₅/NRP-1, co powinno zredukować proces angiogenezy nowotworowej.

Poszukiwanie peptydów i małych cząsteczek, które byłyby inhibitorami kompleksu VEGF-A₁₆₅/NRP-1 odpowiedzialnego za angiogenezę jest oryginalnym podejściem do rozwiązania problemu diagnostyki nowotworowej oraz celowanej terapii radionuklidowej prowadzącej do zahamowania angiogenezy, a zatem wyhamowania procesu nowotworowego. To nie tylko bardzo potrzebne badanie zmierzające do nowych metod diagnostyki i terapii nowotworowej, ale doskonałe pod względem metodologii.

W przypadku W przypadku standardowego podejścia do terapii radionuklidowej mamy do czynienia z nierównomiernym gromadzeniem radiofarmaceutyku w ciele pacjenta i częściowym brakiem kontroli nad dystrybucją źródła promieniowania w tkankach i organach pacjenta, a celem takiej terapii jest zniszczenie komórek guza przez napromienianie, co oznacza że opracowane radiofarmaceutyki powinny być wysoce selektywne i specyficzne

względem molekularnego celu aby koncentrować swoje działanie głównie na ogniskach nowotworowych.

Podjęcie zaprezentowane w niniejszej pracy łączy bezpośrednio napromienianie komórek guza i czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF-A z działaniem chemicznym. Ponieważ na powierzchni wielu typów komórek nowotworowych obserwuje się nadekspresję NRP-1, to radiofarmaceutyk zawierający biomolekułę będącą inhibitorem kompleksu VEGF-A₁₆₅/NRP-1 i jednocześnie chelator (z radioizotopem) o wysokim powinowactwie do NRP-1, który będzie selektywnie trafiał w cel molekularny jakim jest neuropilina NRP-1, będzie hamował proces nowotworowy na dwa sposoby radiacyjnie i chemicznie jako inhibitor zaangażowanego w proces patologicznej angiogenezy kompleksu VEGF-A₁₆₅/NRP-1.

W zależności od wyboru radioizotopu którym znakowany jest koniugat autorka może osiągać różne cele. Emiter pozytonów i w konsekwencji pary kwantów anihilacyjnych, może umożliwić precyzyjne obrazowanie metodą PET, emiter promieniowania γ taki jak ^{99m}Tc umożliwi obrazowanie SPECT, a emitory α lub β będą doskonałymi narzędziami do celowanej terapii radionuklidowej, zaś przy odpowiednio dobranej biomolekule w radiofarmaceutyku można oczekiwać hamowania angiogenezy działaniem inhibitora, bez względu na to czy będziemy znakować farmaceutyk radioizotopem diagnostycznym, czy terapeutycznym, a nawet jeśli mamy do czynienia z „zimnym związkiem odniesienia” zawierającym stabilny izotop pierwiastka w miejsce promieniotwórczego.

Wymienione powyżej argumenty wskazują na perfekcyjnie przemyślany wybór celu badawczego, którego pełna realizacja mogłaby wnieść znaczący postęp w metodach radiacyjnej diagnostyki i terapii nowotworów. Co więcej, przeprowadzone i zaprezentowane w rozprawie badania własności koniugatów, opracowanie i optymalizacja metod ich znakowania radionuklidami diagnostycznymi i terapeutycznymi oraz użyteczności w celowanej diagnostyce i terapii radionuklidowej są zgodne z tematem rozprawy i w pełni temat wyczerpują. Badania zaprezentowane w niniejszej rozprawie są nowatorskim podejściem wykorzystującym metody fizyki jądrowej i chemii radiacyjnej, do badań nowych radiofarmaceutyków dla diagnostyki i terapii nowotworowej, poszerzają wiedzę o metodach otrzymywania wybranych radiofarmaceutyków i wskazują kierunki badań w tej dziedzinie.

b. Wartość naukowa pracy

Współczesne metody leczenia onkologicznego to poza chirurgią onkologiczną, teleradioterapią i brachyterapią - molekularna odmiana brachyterapii w postaci radionuklidowej radioterapii wewnętrznej. Autorka recenzowanej rozprawy postanowiła opracować metodę syntezy inhibitorów połączonego czynnika wzrostu z receptorem i koreceptorem NRP-1 indukujących angiogenezę i w konsekwencji prowadzących do wzrostu guza i jego przerzutów. Badania autorki rozprawy to próby otrzymania radiofarmaceutyków stabilnych w warunkach *in vitro* o wysokim powinowactwie do neuropiliny NRP-1. Przy wysokim powinowactwie do NRP-1 radiofarmaceutyk po związaniu się z receptorem oddziałuje z czynnikiem VEGF-A₁₆₅ tworzącym kompleks VEGF-A₁₆₅/VEGFR-2/NRP-1 odpowiedzialny za patologiczną angiogenezę, co oznacza, że białko koniugatu (inhibitor) blokuje powstawanie kompleksu VEGF-A₁₆₅/VEGFR-2/NRP-1.

Pani Katarzyna Masłowska wybrała do badań pięć biomolekuł – inhibitorów tworzących koniugaty wraz z chelatorami zawierającymi izotop promieniotwórczy lub stabilny izotop odpowiedniego pierwiastka. Szczegółów syntezy peptydowych biomolekuł i syntezy koniugatów inhibitor chelator oraz reakcji znakowania koniugatów radionuklidami ⁶⁸Ga, ⁴⁴Sc i

¹⁷⁷Lu nie oceniam w niniejszej recenzji, jako że moje kompetencje w dziedzinie chemii są ograniczone.

Poza koniugatami znakowanymi radionuklidami autorka wykonuje syntezy „zimnych związków odniesienia” które można syntezować w skali miligramowej, a prowadząc syntezę w takich samych warunkach jak dla przypadku znakowania radionuklidem można łatwo wykonać badania ich właściwości. Badania „zimnych związków” pozwoliły aotorce rpzprawy wykonać chromatogramy mieszanin reakcyjnych i uzyskać wyniki analiz ich mas. Autorka rozprawy prowadzi też badania fizykochemiczne i biologiczne radiokoniugatów aby sprawdzić czy spełniają one warunki stawiane radiofarmaceutynom. Te badania odpowiadają na pytania czy radinuklid uwalnia się z kompleksu, czy jest wyciągany z kompleksu przez związki obecne w płynach ustrojowych, czy jest stabilny w surowicy ludzkiej i czy wykazuje wysokie powinowactwo do NRP-1. W badaniach *in vitro* radiokoniugaty w środowisku prowadzenia reakcji oraz w roztworach CYS i HIS wykazały stabilność, choć wszystkie peptydowe radiokoniugaty okazały się być niestabilne w surowicy ludzkiej (HS).

Pani Katarzyna Masłowska wprowadza czytelnika rozprawy w tematykę prowadzonych badań, co umożliwi jej przejrzyste sformułowanie hipotez badawczych. Doskonale dobiera narzędzia badawcze pozwalające jej w eksperymentach rozstrzygać o prawdziwości stawianych hipotez. Krytycznie analizuje uzyskane wyniki, aby zaproponować kontynuację badań, które mogłyby doprowadzić do opracowania nowego leku (radiofarmaceutyku). Opracowane metody syntezy inhibitorów kompleksu VEGF-A₁₆₅/VEGFR-2/NRP-1 indukujących angiogenezę i w konsekwencji prowadzących do patologicznego unaczynienia, a zatem wzrostu guza i jego przerzutów stanowi istotne osiągnięcie naukowe doktorantki, a opracowanie metody syntezy uzupełnione badaniami fizykochemicznymi i biologicznymi podnoszą istotnie wartość rozprawy.

2. Poprawność redakcyjna rozprawy

Recenzowana rozprawa została napisana przez autorkę niesłuchanie starannie. Została podzielona na cztery rozdziały. Pierwszy rozdział prezentuje cele badawcze pracy. W rozdziale drugim autorka szczegółowo omawia zagadnienia teoretyczne angiogenezy, wskazuje na czynniki chemiczne stymulujące i hamujące angiogenezę. W tym rozdziale przedstawia też sposoby wytwarzania radionuklidów i radiofarmaceutyków.

W trzecim podstawowym rozdziale pracy można znaleźć szczegóły metod eksperymentalnych stosowanych przez autorkę rozprawy przy syntezie biomolekuł, oraz koniugatów zawierających chelator, a także metod znakowania koniugatów radionuklidami ⁶⁸Ga, ⁴⁴Sc i ¹⁷⁷Lu. Rozdział ten zawiera też szczegóły i wyniki badań fizykochemicznych i biologicznych przeprowadzonych przez autorkę i współpracowników.

Czwarty rozdział zawiera załączone opublikowane prace autorki, na których to niniejsza rozprawa jest oparta oraz zgłoszenie patentowe skierowane do Urzędu Patentowego RP. Rozprawę kończy obszerna i wyczerpująca Bibliografia. Styl pracy jest jasny a redakcja rozprawy bez zarzutu.

3. Uwagi krytyczne

Praca jest poprawnie zredagowana, znalazłem jednakże drobne usterki które dla porządku wymienię.

Na str. 38 w wierszu 8 podrozdziału 3.1 pojawia się sformułowanie „Dwóm pozostałym procesom rozpadu (EC i IT) towarzyszy natomiast emisja kwantów gamma...”. Należy zauważyć, że emisja kwantów gamma zwykle towarzyszy również rozpadom α , β^- i β^+ . Po emisji cząstki naładowanej z jądra macierzystego powstaje zwykle jądro potomne w stanie wzbudzonym, a deekscytacja ze stanu wzbudzonego związana jest z emisją kwantu γ .

Na str. 42 w wierszu 5 pojawia się sformułowanie „pole magnetyczne, które służy do przyspieszania...”. Pole magnetyczne (zwykle jednorodne) w cyklotronach służy do utrzymywania przyspieszanych jonów na orbitach kołowych, a przyspieszanie odbywa w szczelinach między duantami, gdzie zmienne pole elektryczne o częstotliwości identycznej do częstotliwości obiegu jonów przyspiesza jony. Przyspieszanie odbywa się więc wielokrotnie dzięki czemu uzyskuje się znaczne zwiększenie energii jonów.

Na str. 42 w wierszu 8 pojawia się sformułowanie „strumień jonów jest kierowany na wprowadzony do układu materiał tarczowy ...”. Zwykle strumień jonów przyspieszany w cyklotronie je wyprowadzany z cyklotronu (poza obszar pola magnetycznego cyklotronu) i dopiero dalej kierowany na materiał tarczowy w jwdnym z jonowodów poza cyklotronem. Materiał tarczowy wprowadza się do wnętrza cyklotronu tylko przy napromienianiu tarczy wiązką wewnętrzną

Na tej samej str. 42 autorka wymienia generatory np. generator $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, a nie wymienia najpowszechniej stosowanego w medycynie nuklearnej generatora $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, choć ten generator wymieniony jest w Tabeli 1 na str. 43

Na str. 42 w wierszu 8 podrozdziału 3.1 pojawia się sformułowanie „Dwóm pozostałym procesom rozpadu (EC i IT) towarzyszy natomiast emisja kwantów gamma...”. Należy zauważyć, że emisja kwantów gamma zwykle towarzyszy również rozpadom α , β^- i β^+ . Po emisji cząstki naładowanej z jądra macierzystego powstaje zwykle jądro potomne w stanie wzbudzonym, a deekscytacja ze stanu wzbudzonego związana jest z emisją kwantu γ .

Na str. 91 w wierszu 2 pod Rysunkiem 53 pojawia się wartość masy obliczonej jako 10405,64. Prawdopodobnie jedno z zer jest zbędne i wartość tej masy powinna być 1405,64.

Wymienione usterki redakcyjne, a nie merytoryczne nie zmieniają mojej wysokiej oceny pracy.

4. Ocena końcowa

Zarówno poszukiwanie odpowiednich inhibitorów jak i opracowanie metod ich wytwarzania oraz badania własności koniugatów, opracowanie i optymalizacja metod ich znakowania radionuklidami diagnostycznymi jest oryginalnym podejściem do rozwiązania problemu diagnostyki nowotworowej oraz celowanej terapii radionuklidowej co prowadzi do wyhamowania procesu nowotworowego. Jest to oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i stanowi istotne osiągnięcie doktorantki co jest wymogiem stawianym rozprawom doktorskim określonym w art. 187 ustawy z 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie

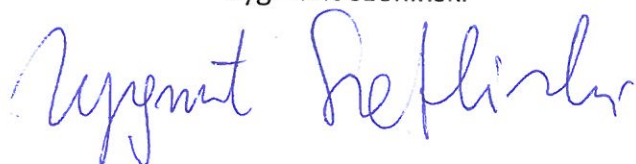
Wyższym i Nauce. Zaprezentowane w rozprawie rezultaty badań doktorantki wskazują to na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i umiejętność prowadzenia pracy zespołowej, co było niezbędne, szczególnie przy prowadzeniu syntezy biomolekuł, radiokoniugatów i ich znakowania. Umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej to drugi warunek stawiany rozprawom doktorskim określony w art. 187 wspomnianej wyżej ustawy. Doktorantka jest pierwszą autorką trzech prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym Cancers w roku 2021 (140 pkt MNiSW), Pharmaceutics w roku 2022 (100 pkt MNiSW) i Biomedicines w roku 2023 (100 pkt MNiSW) co spełnia kolejny warunek wymieniony w art. 11 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. Dodatkowo autorka rozprawy opublikowała artykuł przeglądowy w recenzowanym Raporcie Rocznym IChTJ w roku 2023. Jest też współautorką zgłoszenia patentowego.

Wartość merytoryczna rozprawy wskazuje na dogłębne opanowanie przez doktorantkę fizyki oddziaływania promieniowania jonizującego z materią, umiejętności posługiwania się nowoczesnymi metodami diagnostycznymi wykorzystywanymi w radioterapii i metod wytwarzania i badania własności związków organicznych. Należy zauważyć, że doktorantka realizowała fazę koncepcyjną badania nowych farmaceutyków co było celem jej pracy, a rozprawa wskazuje które ze zbadanych kompleksów mogłyby stanowić cel badań kolejnego etapu badań – etapu badań przedklinicznych.

Wymienione w recenzji osiągnięcia mgr Katarzyny Maśłowskiej zawierają ogromny ładunek nowych interesujących rezultatów, które przyczyniają się do postępu technicznego w metodach radionuklidowej radioterapii wewnętrznej a także tworzenia radiofarmaceutyków. Należy podkreślić, że postęp w procedurach produkcji radiofarmaceutyków diagnozujących patologiczną angiogenezę o zdolnościach do radioterapii ognisk nowotworowych jest bardzo ważnym krokiem poprawiającym jakość leczenia pacjentów.

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Katarzyny Maśłowskiej spełnia wymagania określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz ustawę z 3 lipca 2018 r i wnioskuje o dopuszczenie Katarzyny Maśłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i publicznej obrony.

Zygmunt Szefliński



Wniosek o wyróżnienie pracy mgr Katarzyny Sylwii Maśłowskiej
pt. „*Synteza i badania radioznakowanych peptydomimetycznych inhibitorów
kompleksu VEGF/NRP1 do diagnostyki patologicznej angiogenezy*”

Praca mgr Katarzyna Maśłowska wykonała istotny krok w poszukiwaniu inhibitorów angiogenezy i opracowała metody ich wytwarzania oraz zbadała własności znakowanych izotopami diagnostycznymi i terapeutycznymi koniugatów. W badaniach prowadzonych w kilku zespołach autorka rozprawy opracowała i zoptymalizowała metody ich znakowania koniugatów radionuklidami co jest oryginalnym podejściem do rozwiązania problemu diagnostyki nowotworowej oraz celowanej terapii radionuklidowej. Jej radiofarmaceutyki mogą stanowić cel badań przedklinicznych, a autorka wskazuje które ze zbadanych kompleksów mogłyby rokować nadzieję na wprowadzenie takich radiofarmaceutyków do praktyki klinicznej.

Doktorantka jest pierwszą autorką trzech prac opublikowanych w recenzowanych czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym *Cancers* w roku 2021 (140 pkt MNiSW), *Pharmaceutics* w roku 2022 (100 pkt MNiSW) i *Biomedicines* w roku 2023 (100 pkt MNiSW). Wyróżnienie jej autorstwa pierwszą pozycją wskazuje na jej wiodącą rolę w zespołowych badaniach. Oznacza to, że mgr Katarzyna Maśłowska jest dojrzałym naukowcem.

Wymienione wyżej argumenty skłaniają mnie do przedstawienia wniosku o wyróżnienie rozprawy.

Zygmunt Szefliński

