



Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Zakład Chemii Biomolekularnej

ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; tel. 500-194-120; e-mail anna.janecka@umed.lodz.pl

Prof. dr hab. n.med. Anna Janecka

Łódź, dn. 18 lipca 2023 r.

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Kamila Wawrowicza
pt. „Radiofarmaceutyki oparte na emiterach elektronów Augera $^{193\text{m}}/^{195\text{m}}\text{Pt}$ dla chemo- i
radioterapii nowotworu piersi (HER2+) oraz raka wątrobowokomórkowego”
wykonanej w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej Centrum Radiochemii i Chemii
Jądrowej w Warszawie**

Nowotwory są jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się chorób cywilizacyjnych, a zachorowalność i umieralność na nowotwory gwałtownie wzrasta zarówno na świecie jak i w Polsce. Nowotwory mogą być leczone wieloma metodami, oprócz metod chirurgicznych (gdy jest to możliwe) stosuje się najczęściej chemoterapię, która powoduje silne działania uboczne na zdrowe komórki oraz radioterapię. Ważnym kierunkiem w projektowaniu nowych terapeutyków jest poszukiwanie możliwości specyficznego dostarczania leku do komórki. W przeciwieństwie do metod radioterapii wykorzystujących zewnętrzne źródło wiązki jonów, radioterapia wewnętrzna polega na bezpośrednim podaniu radionuklidów skoniugowanych z wektorem docelowym. W ten nurt badań wpisuje się rozprawa doktorska mgr Kamila Wawrowicza.

Ocena formalna

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra Bilewicza z Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie oraz prof. dr hab. Pawła Krysińskiego z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Promotorem pomocniczym była dr hab. Agnieszka Majkowska-Pilip z IChTJ.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter badawczy, zawiera 106 stron maszynopisu, w tym 34 rysunki i 8 tabel. Rozprawa zbudowana jest w sposób klasyczny, charakterystyczny dla rozpraw doktorskich i obejmuje Spis treści, Streszczenie w języku polskim i angielskim, opis Założeń i celu pracy, Część literaturową przedstawiającą aktualny stan wiedzy związanej z tematyką rozprawy (26 stron), Część doświadczalną (Materiały i metody 16 stron), Wyniki badań własnych (34 stron) oraz Podsumowanie i Wnioski (4 strony). Uzupełnieniem treści rozprawy jest Bibliografia licząca 225 pozycji,

większość z nich to bardzo aktualne prace z ostatnich lat. W rozprawie brakuje mi dorobku naukowego Doktoranta, to znaczy spisu Jego publikacji, udziału w konferencjach, grantach.

Ocena merytoryczna

Część literaturowa została podzielona na 2 główne rozdziały. W pierwszym z nich, zatytułowanym „Nanocząstki w terapii przeciwnowotworowej”, Doktorant wymienił ograniczenia i efekty uboczne klasycznej chemoterapii i radioterapii i omówił wykorzystanie nanotechnologii do pokonywania tych ograniczeń. Nanomateriały stosowane w terapii nowotworów podzielił na organiczne, zbudowane np. z polimerów, liposomów, cząstek lipidowych i nieorganiczne, w tym węglowe czy metaliczne. Tym ostatnim poświęcił więcej uwagi, podkreślając, że nanocząstki metaliczne są szczególnie przydatne do otrzymywania nośników radionuklidów, w tym także emiterów elektronów Augera o wysokim potencjale terapeutycznym, takich jak $^{193m/195m}\text{Pt}$. Dalsza część wstępu literaturowego poświęcona jest terapiom przeciwnowotworowym wykorzystującym nanocząstki, zdefiniowaniu elektronów Augera i ich emiterów oraz nanocząstek będących nośnikami tychże emiterów. Zawarty w Części literaturowej materiał został zebrany na podstawie najnowszej literatury i daje czytelnikowi obraz w jakim kierunku zmierzają nowoczesne terapie przeciwnowotworowe.

Wybór zagadnień przedstawionych w tej części teoretycznej świadczy o właściwym zrozumieniu roli tej części dysertacji, stanowiącej wprowadzenie i uzasadnienie podjętych badań. Część ta stanowi cenne źródło informacji naukowych.

Celem ocenianej rozprawy była „synteza oraz określenie chemo- i radiotoksyczności radioaktywnych nanostruktur opartych na emiterach elektronów Augera $^{193m/195m}\text{Pt}$ dla terapii HER2-pozytywnego nowotworu piersi i raka wątrobowokomórkowego”. W pracy można wyróżnić trzy części; radiochemiczną, chemiczną i biologiczną, które dobrze odpowiadają zawartości pracy.

Radiochemiczna część pracy zakładała syntezę radionuklidów platyny (^{193m}Pt , ^{195m}Pt) będących emiterami elektronów Augera i wykorzystanie ich do syntezy radioaktywnych nanostruktur. Alternatywnym podejściem do terapii elektronami Augera przedstawionym w pracy była immobilizacja łatwo dostępnych radioaktywnych halogenków ^{125}I oraz ^{131}I na powierzchni nanocząstek.

W części chemicznej Autor zajął się syntezą nanocząstek metali szlachetnych, złota i platyny, jako nośników dla emiterów elektronów Augera.

Ostatnia część pracy obejmowała badania *in vitro* na liniach komórek nowotworowych i trójwymiarowym modelu guza, mające na celu ocenę skuteczności działania otrzymanych radiokoniugatów oraz próby określenia mechanizmu odpowiedzialnego za ich aktywność.

Analiza treści części pracy opisującej materiały i metodykę badań pozwoliła na weryfikację przydatności przyjętych metod badawczych do założonych celów pracy. Metody są w pełni wystarczające do realizacji założonych celów i otrzymania opisanych wyników. Nie mam zastrzeżeń co do metod użytych w pracy, są wiarygodne i dobrze odpowiadają założonym celom pracy.

Opis wyników rozpoczyna się od części radiochemicznej, a konkretnie od próby otrzymania radionuklidu platyny ^{195m}Pt poprzez naświetlanie neutronami tarczy ^{193}Ir . Ze względu na przedyskutowane przez Doktoranta trudności, nie udało się wyodrębnić potrzebnej do badań biologicznych ilości czystego izotopu ^{195m}Pt . Natomiast brak dostępu do cyklotronu uniemożliwił otrzymanie izotopu ^{193m}Pt . Dlatego ta część zaplanowanych badań nie była kontynuowana, a badania *in vitro* przeprowadzone zostały na nieradioaktywnych nanocząstkach lub na radioaktywnych nanocząstkach zawierających izotop platyny ^{197}Pt , który udało się otrzymać w wystarczającej ilości.

Kolejny rozdział pracy dotyczy syntezy i charakterystyki nanocząstek. Jako transportery emiterów elektronów Augera Doktorant otrzymał dwa rodzaje nanocząstek, nanocząstki złota pokryte platyną o średnicy 30 nm i małe nanocząstki platyny o średnicy 2 nm, co miało mu pozwolić na zaobserwowanie różnic i ograniczeń przy ich zastosowaniu w terapii elektronami Augera. Otrzymane nanocząstki były następnie skoniugowane z trastuzumabem. Tu brakuje mi kilku słów wstępu, co to jest trastuzumab. Dlaczego wybrano właśnie ten związek? Aby kontrolować reakcję przyłączenia trastuzumabu do nanocząstek Doktorant wyznakował go izotopem ^{131}I i zastosował radiometryczną metodę detekcji. Badanie stabilności otrzymanych biokoniugatów pod kątem ich przechowywania przeprowadzone było w temperaturze 37°C i 4°C i wykazało, że mogą być przechowywane w tych temperaturach przez okres odpowiednio 7 i 10-12 dni. Stabilności w surowicy nie udało się oznaczyć ze względu na dużą ilość białek uniemożliwiających analizę.

Niektóre nowotwory piersi charakteryzują się nadekspresją receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu HER2. To powierzchniowe białko jest zaangażowane w przekazywanie komórkom sygnałów związanych z kontrolą ich wzrostu i funkcjonowania, a jego nadekspresja z agresywniejszym rozrostem raka piersi. Dalsze badania dotyczyły sprawdzenia, czy zbudowane z nanocząstek i trastuzumabu biokoniugaty są w stanie wiązać się specyficznym z komórkami, które wykazują nadekspresję receptora HER2. Do tego celu Doktorant wybrał dwie linie komórkowe z nadekspresją tego receptora, raka jajnika SKOV-3 i raka piersi BT474. Dla porównania używana była linia raka piersi MDA-MB-231, która nie wykazuje nadekspresji HER2. Jak wykazał, niezależnie od średnicy nanocząstek oba radiobiokoniugaty zawierające ^{197}Pt łączyły się specyficznym z receptorami HER2, a frakcja związana stanowiła około 6-7% całkowitej, co stanowi dobry wynik. Szkoda, że Doktorant w opisie wiązalności do receptora nie wspomniał, jakie komórki były użyte w doświadczeniu, wynika to dopiero z rysunku.

Kolejnym nowotworem, który znalazł się w kręgu zainteresowań mgr Wawrowicza był rak wątrobowokomórkowy (HCC). W przeciwieństwie do HER2-zależnych nowotworów piersi, w przypadku tego nowotworu nie znaleziono potencjalnych celów molekularnych na powierzchni komórek, co uniemożliwia opracowanie biokoniugatów do terapii celowanej.

Poszukując związku, który mógłby specyficznym naprowadzać radiobiokoniugat na komórki HCC Doktorant zwrócił uwagę na krótki peptyd SP94, którego prawdopodobnym celem jest receptor GRP78. Białko to należy do białek szoku cieplnego i jest odpowiedzialne

za syntezę białek w retikulum cytoplazmatycznym. W nowotworach złośliwych o dużych skłonnościach do przerzutowania białko to ulega translokacji do błony komórkowej.

Dr Wawrowicz postanowił użyć peptydu SP94 jako cząsteczki naprowadzającej biokoniugat na komórki HCC. Peptyd skoniugowany z chelatorem DOTA i wyznakowany ^{177}Lu został użyty w próbie określenia jego powinowactwa do receptora GRP78 w komórkach raka wątroby HepG2. Ta próba nie powiodła się, czego przyczyną, według Doktoranta, mogła być niewystarczająca ekspresja tego receptora w użytych komórkach. Z opisu nie wynika czy Doktorant sam wyznakował, czy też kupił znakowany lutem biokoniugat?

Z powodu niepowodzenia koncepcji związanej z naprowadzaniem biokoniugatu na cel molekularny Doktorant postanowił sprawdzić, czy otrzymane przez niego nanocząstki, po ich stabilizacji polimerem PEG-COOH i wyznakowaniu ^{197}Pt będą zdolne do penetrowania błony komórkowej HepG2 i internalizacji. Badania były przeprowadzone metodą detekcji radiometrycznej oraz przy użyciu mikroskopii konfokalnej. W tym przypadku wyniki okazały się obiecujące. Internalizacja zachodziła już po 6 h i nasilała się w czasie. Zarówno nanocząstki o większej jak i mniejszej średnicy zachowywały się podobnie. Nanocząstki po internalizacji lokalizowały się w okolicy jądra komórkowego. Wykorzystanie mikroskopii konfokalnej pozwoliło zaobserwować w komórkach zmiany charakterystyczne dla procesu apoptozy.

Dlatego badanie mechanizmu biologicznej aktywności nanocząstek platyny było logiczną kontynuacją badań. W pierwszym etapie określony został poziom cytotoksyczności nanocząstek Au@Pt i PtNPs oraz ich biokoniugatów z trastuzumabem testem MTS na linii raka jajnika SKOV-3 i nowotworu wątrobowokomórkowego HepG2, które charakteryzują się podwyższonym w stosunku do prawidłowych komórek potencjałem oksydacyjnym. Możliwość wykorzystania stresu oksydacyjnego w terapii przeciwnowotworowej została opisana w części literaturowej. Przeżywalność komórek SKOV-3 nie uległa zmianie pod wpływem wymienionych powyżej związków, stosowanych w szerokim zakresie stężeń, natomiast w komórkach HepG2 widoczny był efekt cytotoksyczny. Fakt ten Doktorant wyjaśnił wyższym potencjałem oksydacyjnym komórek HepG2 i potwierdził oznaczając poziom markerów stresu oksydacyjnego, zredukowanej formy glutationu i reaktywnych form tlenu. Porównując zmiany morfologiczne w komórkach HepG2 traktowanych nanocząstkami Au@Pt lub PtNPs Doktorant stwierdził, że nanocząstki o mniejszej średnicy (PtNPs) silniej oddziaływały na komórki nowotworowe.

W dalszej kolejności Doktorant chciał sprawdzić, czy otrzymane przez niego nanocząstki platyny ulegają rozpuszczeniu w środowisku utleniającym, dając jony Pt^{2+} , mogące przenikać do jądra komórkowego. Przedstawione wyniki pokazały, że jest to prawdopodobne jedynie w przypadku mniejszych nanocząstek PtNPs. Doktorant był jednak ostrożny z wyciąganiem jednoznacznych wniosków, co świadczy o jego naukowej dojrzałości. Wykonane z użyciem cytometrii przepływowej badania procesu apoptozy oraz cyklu komórkowego potwierdziły wcześniej opisane wyniki.

Ostatnia część dysertacji dotyczy łączonej chemo- i radioterapii w leczeniu nowotworów wątroby, a badania były jak poprzednio przeprowadzone na komórkach HepG2, które mają bardzo wysoki poziom nadtlenku wodoru. Ponieważ doktorantowi nie udało się otrzymać radionuklidów $^{193\text{m}}\text{Pt}$ i $^{195\text{m}}\text{Pt}$, użył otrzymanych nanocząstek platynowych jako

nośników dla izotopu ^{125}I lub tańszego izotopu ^{131}I . Atomy jodu mają silne powinowactwo do powierzchni metali szlachetnych. Ponieważ komórki HepG2 zawierają nienormalnie wysoki poziom nadtlenu wodoru Doktorant postawił hipotezę, że w obecności nadtlenu wodoru utlenianie ^{125}I nastąpi na powierzchni nanocząstek Au@PtNP i PtNPs, a ^{125}I będzie łatwo z nich uwalniany i będzie mógł swobodnie dyfundować w pobliże DNA.

Proponowane radiokoniugaty miały spełniać kryteria, niezbędne do skutecznej terapii elektronami Augera, a pokazana wcześniej wysoka toksyczność nieradioaktywnych nanocząstek w stosunku do komórek HepG2, związana z wewnątrzjądrowym wychwytem PtNP stanowiła dodatkową korzyść. Zatem zaproponowane przez Doktoranta radiokoniugaty powinny umożliwiać selektywne działanie chemo- i radiotoksyczne na komórki HepG2, mimo że nie posiadały wektora nakierowującego. Dla porównania użyte były komórki gruczolaka (HeLa), które nie wykazują właściwości oksydacyjnych. Przeprowadzone badania pokazały, że użyte radiokoniugaty charakteryzowały się wysoką selektywnością uzyskaną dzięki desorpcji radionuklidów w mikrośrodku zawierającym nadtlenu wodoru, a więc w komórkach HepG2, a nie w komórkach HeLa. Doktorant stwierdził, że efekt terapeutyczny był skorelowany z uszkodzeniem komórek na różnych poziomach molekularnych, w tym z pęknięciami dwuniciowymi DNA i był zależny od dawki. Zastosowanie sferoidów jako trójwymiarowego modelu guza ujawniło aktywność przeciwnowotworową radiokoniugatów również w takim układzie.

Na koniec mam kilka uwag krytycznych:

Po przeczytaniu pracy moje zdziwienie wzbudził tytuł „Radiofarmaceutyki oparte na emiterach elektronów Augera $^{193\text{m}}, ^{195\text{m}}\text{Pt}$...”. Skoro nie udało się otrzymać tych izotopów byłoby chyba lepiej nie umieszczać ich w tytule.

W spisie treści brakuje podziału na Część Literaturową i Doświadczalną, mimo, że w treści pracy takie tytuły występują.

W spisie odczynników nie są umieszczone radioaktywne nuklidy używane w doświadczeniach, ani źródło ich pochodzenia.

Podrozdział Wstęp i Cel Pracy znajduje się w tekście pod tytułem Część Literaturowa. Uważam, że nie jest to właściwe.

W wykazie skrótów brakuje niektórych z nich, np. GSH, NAC.

Str.11 – „zdefektowany śródbłonek” można by zastąpić jakimś innym słowem, np. nieprawidłowo zbudowany czy wadliwy

W polskojęzycznej literaturze używane są terminy chemoterapia i chemioterapia, ale w pracy należałoby zdecydować się na jeden z nich i nie używać ich naprzemiennie.

Podrozdział 6.4.5. i rys 26 – nie podano na jakich komórkach były prowadzone badania.

Powyższe uwagi mają raczej charakter redakcyjny i nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej mgr Wawrowicz.

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że Doktorant wykazał się szeroką wiedzą w tematyce rozprawy doktorskiej i zrealizował założone cele badawcze uzyskując oryginalne rozwiązanie

problemu naukowego. Praca jest eksperymentalnie bardzo obszerna, przeprowadzona wnikliwie i zgodnie z wysokimi standardami naukowymi.

Przeprowadzone badania pokazały, że skojarzona terapia chemo-Auger ma addytywne działanie chemotoksyczne nanocząstek PtNPs i radioterapeutyczne działanie elektronów Augera emitowanych z izotopu ^{125}I , występujące, co ważne, tylko w środowisku o podwyższonym potencjale oksydacyjnym komórek raka wątroby HepG2, a więc powinna być bezpieczna dla komórek prawidłowych.

Wachlarz zdobytej wiedzy i umiejętności praktycznych spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Doktorant wykazał się samodzielną pracą naukową, dokonał szeregu istotnych odkryć i zidentyfikował mechanizmy cytotoksycznego działania otrzymanych radiokoniugatów w komórkach rakowych. Zakres stosowanych metod jest szeroki, od syntezy radionuklidów i nanocząstek do badań *in vitro* prowadzonych na ludzkich liniach komórkowych. Należy tutaj podkreślić, że poszczególne doświadczenia wykonano w wymaganej ilości powtórzeń, a uzyskane wyniki były starannie zanalizowane pod względem istotności statystycznej i zilustrowane na odpowiednich wykresach i fotografiach. Opisane badania, dotyczące bardzo istotnych i aktualnych zagadnień naukowych, zostały wykonane z wykorzystaniem nowoczesnych i dobrze dobranych metod, które pozwoliły na uzyskanie wartościowych i ważnych poznawczo wyników. Uważam, że mgr Kamil Wawrowicz zrealizował założone cele badawcze i stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszystkie wymogi ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. Tym samym z pełnym przekonaniem wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej o dopuszczenie mgr Kamila Wawrowicza do dalszych etapów postępowania związanego z nadaniem stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę szeroki zakres przeprowadzonych badań i ich aktualność jak i wartość merytoryczną uzyskanych wyników i ich znaczenie dla badań nad nowymi terapiami przeciwnowotworowymi wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.

