

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

Ocena rozprawy doktorskiej

**Pana mgr Kamila Wawrowicza**

„Radiofarmaceutyki oparte na emiterach elektronów Augera  $^{193m,195m}\text{Pt}$  dla chemo- i radioterapii nowotworu piersi (HER2+) oraz raka wątrobowokomórkowego”,  
wykonanej pod opieką promotorów

Pana prof. dr hab. Aleksandra Bilewicza i Pana prof. dr hab. Pawła Krysińskiego  
oraz promotora pomocniczego

Pani dr hab. inż. Agnieszki Majkowskiej-Pilip  
zrealizowanej

w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej, Centrum Radiochemii i Chemii Jądrowej, Pracowni Chemii Radiofarmaceutycznej

### **Informacje ogólne**

- Recenzja, przedstawionej mi do oceny pracy, została przygotowana na podstawie pisma Pani dr Katarzyny Kiegiel – sekretarza Rady Naukowej IChTJ w oparciu o uchwałę komisji doktorskiej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora dla mgr Kamila Wawrowicza z dnia 5 czerwca 2023.

Rozprawa doktorska stanowi zwarte opracowanie, przygotowane w języku polskim, liczące 106 stron, 34 rysunki, zawierające streszczenie, streszczenie w języku angielskim oraz Wstęp i cel pracy, a także rozdziały; 1. Nanocząstki w terapii przeciwnowotworowej, 2. Elektrony Augera w nowoczesnej celowanej radioterapii 3. Wykorzystywane odczynniki 4. Techniki i aparatura pomiarowa 5. Metodyka przeprowadzonych badań 6. Wyniki i dyskusja 7. Podsumowanie i wnioski 8. Bibliografia.

Praca została przygotowana zgodnie z zasadami przyjętymi dla rozpraw naukowych i jej strona formalna nie budzi zastrzeżeń.

### **Merytoryczna ocena pracy**

Rak jest drugą najczęstszą przyczyną śmierci Polaków (228 na 100 tys. mieszkańców). Niezależnie od przyczyn tak wysokiej śmiertelności, niewątpliwie poszukiwanie nowoczesnych metod terapii przeciwnowotworowej jest uzasadnione w najwyższym stopniu. Podjęte przez

mgr Kamila Wawrowicza badania są więc bardzo potrzebne, a jednocześnie trudne z uwagi na ich interdyscyplinarny charakter.

We wstępie Kandydat podkreślił, że współczesne próby stworzenia nowatorskiej terapii antynowotworowej powinny łączyć w sobie kilka fundamentalnych cech jak: celowane dostarczanie leku do komórki nowotworowej, selektywne działanie wobec niej oraz wielokierunkowy sposób oddziaływania leku na komórkę nowotworową. Istotnym elementem poszukiwania właściwego terapeutyku było wykorzystanie naturalnych cech morfologiczno-metabolicznych określonych komórek do aktywizacji działania terapeutyku. Kandydat wskazał na komórki o wysokim potencjale oksydacyjnym (jak rak wątrobowokomórkowy czy niektóre nowotwory piersi) i możliwość wykorzystania tej cechy do „włączania” procesu terapii. Zatem, terapeutyk skupiający w sobie różne możliwości działania w połączeniu ze specyfiką określonego nowotworu powinien wykazywać wysoki stopień skuteczności działania. Kierując się tą myślą Kandydat postanowił zaprojektować terapię opartą na radiofarmaceutykach i nanoradiofarmaceutykach, skierowaną przeciwko nowotworom o nadprodukcji  $H_2O_2$ . Pan mgr Wawrowicz określił cel swojej pracy doktorskiej jako „synteza oraz określenie chemo- i radiotoksyczności radioaktywnych nanostruktur opartych na emiterach elektronów Augera  $^{193m,195m}Pt$  oraz  $^{125}I$  do terapii HER2+ nowotworu piersi i raka wątrobowokomórkowego”. Koncepcja ta wydaje się interesująca i nowatorska oraz naukowo uzasadniona. Praca obejmowała wykonanie syntezy nanocząstek metali szlachetnych jak Au, Pt i Au@Pt jako nośników dla emiterów elektronów Augera oraz ich modyfikację powierzchniową. Nanoterapeutyki badano na liniach komórek nowotworowych i modelu guza 3D.

W Części literaturowej pracy Kandydat wnikliwie opisał stan wiedzy i badań naukowych w zakresie podjętego tematu pracy. W pierwszej części zostały przybliżone nanocząstki, które są lub mogą być zastosowane w tworzeniu terapeutyku, przede wszystkim jako niezastąpione nośniki i molekuly łatwe do modyfikacji. Zwłaszcza, nanocząstki lipidowe, stanowiące gros, dopuszczonych do terapii leków antynowotworowych są składnikiem tych nowoczesnych leków. Część nanocząstek stanowi nie tylko platformę nośną lecz również substancję aktywną (tlenek żelaza, tlenek hafnu). Autor pracy syntetycznie opisał nanocząstki jako leki i ich nośniki, opierając się na aktualnych badaniach prowadzonych na świecie. Ponadto, Kandydat nakreślił metody terapii z wykorzystaniem nanocząstek i ich zdalnej aktywacji z zastosowaniem promieniowania elektromagnetycznego o różnej długości fali. Przede wszystkim, Autor skoncentrował się na radioaktywnych nanokompleksach, ich konstrukcji i zasadach działania. W rozdziale 1 „Nanocząstki w terapii przeciwnowotworowej” uwzględniony został również podrozdział na temat nanobrachyterapii i terapii celowanej jako dwu różnych metod prowadzących do retencji nanocząstek w obrebie czy okolicach guza. Kolejnym ważnym podrozdziałem była część dotycząca stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych, co w przypadku przeprowadzonych badań przez kandydata ma podstawowe znaczenie i stanowi cel modyfikacji terapeutycznej w komórce nowotworowej.

Rozdział 2 przeglądu literatury został dedykowany zastosowaniu elektronów Augera w nowoczesnej, celowanej radioterapii. Wybór tego rodzaju emisji energii wydaje się uzasadniony z uwagi na jej zasięg i efektywną destrukcję wobec DNA, błony komórkowej i

mitochondrium komórki nowotworowej. Autor wnikliwie opisał emitery elektronów Augera i ich efektywność terapeutyczną, a także platformy organiczne i nieorganiczne do ich transportu. Część ta jest doskonale analizowana przez Autora, prowadząc wniosku na temat potencjału i przyszłości zastosowania tej metody w terapii nowotworów. Na zakończenie przeglądu literatury kandydat szczegółowo scharakteryzował radionuklidy izotopów Pt (<sup>193m</sup>, <sup>195m</sup>, <sup>197</sup> Pt) oraz jodu (<sup>125</sup> I) i możliwości zastosowania ich w terapii, a także przybliżył założenia terapii skojarzonej.

Część pracy będąca przeglądem literatury nakreśla state of the art problemu, jaki Autor podjął się rozwiązać. Kandydat cytuje najnowszą literaturę światową, a problematyka została omówiona w sposób syntetyczny, wnikliwy merytorycznie i logiczny. Jednak, moim zdaniem, rozdziały 1 i 2 powinny stanowić część zwykle nazywaną przeglądem literatury, zakończoną celem i zakresem pracy (cel pracy powinien wynikać również z przeglądu literatury i wskazania na nierozwiązane problemy). Kolejna część pracy stanowi Materiał i metody, co zostało rozdrobnione na szereg równorzędnych rozdziałów. W tekście jest co prawda nagłówek Część literaturowa i część doświadczalna, jednak nie są one wyszczególnione w spisie treści i nie stanowią punktowanych rozdziałów. Uwaga ta, chociaż nie ma znaczenia dla oceny merytorycznej pracy, jednak pozwoliłaby na bardziej przejrzystą organizację tekstu. Ponadto, jako recenzent, sugerowałabym uwzględnienie krótkiego podrozdziału dotyczącego zastosowanych w pracy komórek nowotworowych (m.in. SKOV-3, HepG2), a zwłaszcza specyfiki ich cech biologicznych czy metabolicznych. Można również zadać klasyczne pytanie; czy można było uwzględnić również, dla porównania, komórki nienowotworowe (HepG2 vs. THLE3), jakkolwiek często jest to bardzo trudne a czasem wręcz niemożliwe do zrealizowania.

Część doświadczalna pracy została opisana w sposób niezwykle dokładny i precyzyjny. Wszystkie opisane procedury analityczne, użyte do badań materiały oraz wykorzystana aparatura zostały opisane w sposób optymalny, pozwalający na powtórzenie przeprowadzonych badań. Opisana metodologia analityczna dokumentuje wiarygodność, rzetelność oraz powtarzalność prezentowanych eksperymentów. Postępowanie analityczne, przeprowadzone przez Kandydata, dowodzi dużego zaangażowania, wiedzy i zdolności badawczych, a także dojrzałości naukowej, co jest niewątpliwie godne podkreślenia. Ten rozdział pracy, jako recenzent oceniam bardzo wysoko.

Kolejną, najtrudniejszą częścią pracy są wyniki i dyskusja. Wyniki i dyskusję podzielono na podrozdziały co pozwoliło na jej uporządkowanie w kontekście dużego zakresu badań i ich interdyscyplinarności (badania fizyko-chemiczne i biologiczne). Pierwsza część dyskusji dotyczyła otrzymywania radionuklidów platyny. Kandydat w bardzo interesujący sposób przedyskutował uzyskane wyniki, odnosząc się do niepowodzeń, trudności i poszukiwań właściwej drogi analitycznej dla uzyskania wiarygodnych wyników. Uzyskane nanocząstki Pt i kompleksy Au@Pt zostały dobrze scharakteryzowane, jakkolwiek zazwyczaj przyjmuje się dwie różne metody dla udokumentowania tożsamości i charakteryzacji nanocząstek. W pracy, charakteryzacja PtNPs jest dość skąpa i oparta jedynie na obserwacji z zastosowaniem TEM, a zamieszczone w pracy zdjęcie nie jest najlepszej jakości.

Moja drobna uwaga dotyczy badania stabilności koloidów PtNP-PEG-trastuzumab za pomocą TEM. Szkoda, że nie uwzględniono zdjęć z wizualizacji korony otaczającej PtNP, bo chociaż nie stanowi to jednoznacznego dowodu tożsamości składników otoczki, jednak jest dowodem jej istnienia i wskazywać może na brak nanocząstek bez otoczki oraz nadmiar białka niezwiązanego z PtNP.

Bardzo ciekawe są wyniki badań biologicznych, zaprojektowane, przeprowadzone i opisane w sposób przejrzysty, a przedyskutowane na doskonałym naukowym poziomie z uwzględnieniem aktualnej literatury i własnych spostrzeżeń. Moja uwaga dotyczy również stwierdzenia braku możliwości zbadania otrzymanych związków w szerokim zakresie stężeń (str 61), co Autor tłumaczy dwoma mechanizmami, jednak niepopartymi literaturą. Zazwyczaj, to typowe zachowanie nanocząstek występuje wskutek ich aglomeracji i może być niezależne od rodzaju naczynia czy komórek. Interesujący wynik Kandydat uzyskał w badaniu z wykorzystaniem receptora HER2. Jaka, zdaniem Autora jest hipotetyczna przyczyna różnicy pomiędzy komórkami SKOV-3 i MDA-MB-231 uzasadniająca odmienną reakcję i czy jest ona dowodem braku specyficzności czy być może innymi mechanizmami, a m.in. zdolnością komórki MDA-MB-231 do ukrycia receptora HER2? Drobna uwaga recenzenta dotyczy również faktu, że Rysunek 19 jest nieprecyzyjnie i niejasno opisany, m.in. brak opisu rys. 19B, może należało oddzielić wizualizację od wyniku detekcji radiometrycznej?

Kolejna część Wyników i dyskusji „Określenie mechanizmu biologicznej aktywności nanocząstek platyny” jest bardzo interesującą, zwłaszcza w kwestii wykazania roli potencjału antyoksydacyjnego komórki (poziom glutationu) we wrażliwości na działanie nanocząstek platyny i wskazania na kluczową rolę platyny w indukowaniu produkcji ROS. Dalsza część rozdziału Wyniki i dyskusja dotyczyła koncepcji terapii kombinowanej (chemo- i radioterapii). Kandydat przedyskutował w bardzo interesujący i logiczny sposób swoje postępowanie badawcze z uwzględnieniem różnych trudności analitycznych, wyborem optymalnych metod postępowania, ich założeń naukowych i interpretacji wyników. Przeprowadzona dyskusja świadczy o dużej dojrzałości naukowej Kandydata, jego wiedzy i determinacji w badaniach. Jednak, nasuwa się pytanie, dlaczego w kluczowym doświadczeniu, dotyczącym przeżywalności komórek HepG2 vs. HeLa traktowanych radiokoniugatami, nie uwzględniono dla porównania grupy otrzymującej same nanocząstki Pt (rys 30)?

Bardzo interesujące badania wykonane zostały przez kandydata na sferoidach. Badania na liniach komórkowych pozwalają na zaobserwowanie pewnych mechanizmów, uzyskanie wyników wstępnych, jednak dopiero badania na modelu 3D pozwalają na pełniejsze odniesienie wyników do rzeczywistych warunków potencjalnej terapii. Uzyskane przez Kandydata wyniki są bardzo interesujące i niewątpliwie wskazują na potencjalny sukces terapeutyczny radiokoniugatów  $^{125}\text{I}$ -PtNPS wobec guza HCC. Jednak, jako recenzent, sugerowałabym porównanie  $^{125}\text{I}$ -PtNPS i PtNPS w takim samym czasie i koncentracji nanocząstek Pt. Moja uwaga dotyczy również opisu kluczowego Rys. 33, który jest nieprecyzyjnie opisany i niezbyt czytelny. Podstawową zasadą przygotowywania prac naukowych jest fakt, że tabela i rysunek powinny być absolutnie zrozumiałe „po wyjęciu z tekstu”.

Praca została zakończona rozdziałem Podsumowanie i wnioski. Podsumowanie zostało nakreślone w sposób bardzo dojrzały i odpowiedzialny, ze wskazaniem sukcesów badań, jak również kwestii nie rozwiązanych. Załączony graficzny mechanizm przypuszczalnej aktywności radiokoniugatu jest również rozwiązaniem bardzo ułatwiającym zrozumienie pracy, a także przejawem wiedzy i dojrzałości naukowej Kandydata. Wnioski podzielono na grupy tematyczne, co jest bardzo korzystnym rozwiązaniem w kontekście tak dużej ilości uzyskanych nowych obserwacji i wyników przeprowadzonych badań. Wszystkie wnioski uważam za dobrze sformułowane, uprawnione i ważne, a zwłaszcza dla poszukiwań nowych sposobów terapii antynowotworowej.

Reasumując, można niewątpliwie stwierdzić, że przeprowadzone przez Pana mgr Kamila Wawrowicza badania są nowatorskie, doskonale opracowane, przedyskutowane i podsumowane celnymi, syntetycznymi wnioskami. Badania przyczyniają się do postępu w zakresie poszukiwania nowych metod terapii przeciwnowotworowej. Pytania i sugestie Recenzenta mają charakter dyskusji i nie wpływają na bardzo dobrą ocenę pracy.

### **Podsumowanie recenzji**

Badania, jakie podjął Pan mgr Kamil Wawrowicz są interdyscyplinarne, nowatorskie, przygotowane na wysokim poziomie merytorycznym i bez wątplenia mają wpływ na rozwój dyscypliny i postęp w zakresie poszukiwania nowych metod leczenia nowotworów w Polsce i na świecie. W konkluzji recenzji stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska **Pana mgr Kamila Wawrowicza** odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz.U z 2017 r., poz. 1789) w związku z artykułem 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz.1669 oraz art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające Ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, który stanowi, że przewody doktorskie, wszczęte i niezakończone przed dniem wejścia w życie ustawy, o której mowa w art.1, są przeprowadzane na dotychczasowych zasadach z tym, że jeżeli nadanie stopnia doktora następuje po dniu 30 kwietnia 2019 r. stopień nadaje się w dziedzinach i dyscyplinach określonych w przepisach wydanych na podstawie art.5 ust. 3 tej ustawy. Niniejszym, przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej wnioski o dopuszczenie mgr Kamila Wawrowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę również o wyróżnienie pracy doktorskiej z uwagi na wysoce nowatorski charakter badań, bardzo duży potencjał naukowy i aplikacyjny uzyskanych wyników na poziomie krajowym i międzynarodowym.

Ewa Sawosz Chwalibóg, 10.07.2023

