



Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Kingi Żelechowskiej-Matysiak

pt: **Biokoniugaty radioaktywnych nanocząstek złota z przyłączonym chemioterapeutycznym dla celowanej terapii przeciwnowotworowej**
napisanej pod kierunkiem dr hab. inż. Agnieszki Majkowskiej-Pilip, prof. ICHTJ
oraz prof. dra hab. n.med. Leszka Królickiego.

Rozprawa doktorska Pani Kingi Żelechowskiej-Matysiak dotyczy bardzo aktualnej tematyki - syntezy i analizy właściwości biologicznie czynnych układów zawierających krótkożyciowe izotopy. Tematyka ta bardzo dobrze wpisuje się we współczesne trendy rozwoju badań radiochemicznych mających na celu syntezę radiobiokoniugatów służących do leczenia różnego rodzaju zmian chorobowych.

Obecnie obserwuje się znaczący wzrost zapadalności na choroby nowotworowe, z czego jednymi z najpowszechniejszych są nowotwory piersi, płuc czy prostaty. Mając na uwadze powyższe poszukuje się skutecznych strategii terapeutycznych, w których to coraz większy nacisk kładzie się na zastosowanie efektu synergii różnych oddziaływań, tj. np. jednoczesnej radio- i chemioterapii. Można to osiągnąć wprowadzając do ciała pacjenta biokoniugaty zawierające radioizotop oraz chemicznie czynną substancję.

Współczesne radiofarmaceutyki mają często bardzo skomplikowaną budowę zawierając w sobie różnego rodzaju molekuły, których zadaniem jest nakierowanie takiego układu na zmianę nowotworową wykorzystując powinowactwo do określonego typu receptorów. Ich istotnym elementem jest także izotop promieniotwórczy. Spośród wielu znanych radioizotopów w terapii z wykorzystaniem radiofarmaceutyków wykorzystywane są te, których czasy półtrwania są na tyle długie, aby zniszczyć zmianę nowotworową, ale jednocześnie na tyle krótkie, aby pacjent nie otrzymał niepotrzebnie dużych dawek promieniowania. Jednym z takich izotopów jest złoto-198 o okresie półtrwania ok. 2,7 dnia ulegające przemianie beta minus z towarzyszącą emisją kwantów



promieniowania gamma o energii ok. 412 keV oraz intensywności 96%. Właściwości chemiczne tego pierwiastka umożliwiają przygotowanie jego inertnych cząstek o pożądanym kształcie i rozmiarze, które to mogą być podłączone do tzw. linkera a ten do np. określonego przeciwciała.

Pani mgr Żelechowska-Matysiak stanęła przed bardzo ambitnym wyzwaniem mającym na celu syntezę, charakterystykę fizykochemiczną oraz badania biologiczne potencjalnych radiofarmaceutyków zawierających nanocząstki złota zawierające złoto-198 wraz z doksorubicyną i/lub trastuzumabem lub trastuzumabem/emtanzyną. Badania te miały aplikacyjny charakter czego odzwierciedleniem jest zgłoszenie patentowe dotyczące koniugatów Tmab-emtazyna znakowanych izotopowo o właściwościach przeciwnowotworowych.

Przedstawiona do oceny praca zawiera łącznie 151 stron, 13 tabel, 65 rysunków oraz 257 poprawnie dobranych i reprezentatywnych odnośników literaturowych. Ma ona klasyczny układ. Zawiera część literaturową, w której przedstawiono zarys metod leczenia nowotworów, podstawowe zagadnienia dotyczące chemioterapii, w tym grupy stosowanych substancji i mechanizmy ich działania. Szczególną uwagę poświęcono antracyklinom, których jedną z najważniejszych, z punktu widzenia zastosowania w medycynie, jest doksorubicyna. Podrozdział 2.2.1.1. został w całości poświęcony opisom jej struktury, schematom działania i sposobom dostarczania w obręb zmiany chorobowej. Pewne nieścisłości pojawiają się podczas opisu jej budowy. Przykładowo na rysunku 2.4 Doktorantka podaje schemat powstawania reaktywnych form tlenu z udziałem DOX. Jest on zaczerpnięty z publikacji Szulawskiej i Czyża (ref. 37). Jednak bliższa analiza tej pozycji literaturowej wskazuje, że autorzy opisując właściwości i działanie antracyklin opierali się na publikacji autorstwa Minotti i wsp. *Pharmacol. Rev.* 56:185–229, 2004. W źródłowym odwołaniu struktura chinonu w DOX jest już odpowiednia.

Kolejne podrozdziały poświęcone zostały opisowi związków stosowanych w celowanej molekularnie terapii. Przedstawiono sposoby produkcji przeciwciał monoklonalnych. Jednym z ich przykładów jest trastuzumab. Omówiono przykłady koniugatów przeciwciało-lek. Jednym z nich była stosowana w badaniach kadcyła®.

W kolejnym fragmencie części literaturowej Doktorantka skupiła się na charakterystyce celowanej terapii radionuklidowej. Ogólna charakterystyka wybranych radioizotopów terapeutycznych została zaprezentowana w tabeli 2.5 na stronie 37. Mam pewne uwagi do treści tej tabeli. Astat-211 ulega także przemianie EC (58%), której nie uwzględniono a emisja promieniowania gamma dla tego radionuklidu zachodzi z bardzo małą wydajnością. Dla porządku warto też nadmienić, że wszystkim z izotopów wymienionych jako emitery elektronów Augera



podczas przemiany towarzyszy emisja promieniowania gamma (nie tylko Ga-67). W rozważaniach tych nie uwzględniam właściwości ewentualnych, możliwych promieniotwórczych izotopów potomnych. W rozdziale tym Pani Zelechowska-Matysiak wskazała także możliwe do zastosowania wektory.

Warto zwrócić uwagę na to, że Doktorantka podała wiele przykładów radiofarmaceutyków i/lub ogólniej substancji terapeutycznych dopuszczonych w terapii oraz badań z nimi związanymi, co świadczy o bardzo dobrej znajomości omawianej tematyki.

Część literaturową zamyka obszerny fragment poświęcony nanocząstkom jako nośnikom leków i radionuklidów. Został on napisany przejrzysto i syntetycznie.

Kolejna część pracy poświęcona została metodologii prowadzonych badań, w której Doktorantka opisała stosowane metody i techniki analityczne takie jak mikroskopię elektronową, technikę dynamicznego rozpraszania światła, chromatografię cienkowarstwową, mikroskopię fluorescencyjną, konfokalną, test cytotoxycywności czy cytometrię przepływową. Ich różnorodność stanowi także o wysokim poziomie prowadzonych badań. W podrozdziale dotyczącym pomiarów spektrofotometrycznych warto byłoby dodać, obok charakterystyki (λ_{\max} , ϵ) trastuzumabu, także wartości ww. parametrów dla pozostałych badanych substancji.

W rozdziale poświęconym metodyce prowadzonych badań Pani Zelechowska-Matysiak omówiła sposoby syntezy nanocząstek złota, otrzymywanie wybranych koniugatów oraz metodykę hodowli linii komórkowych, wiązalności do receptora, internalizacji, badania cytotoxycywności, cyklu komórkowego oraz apoptozy komórek. Eksperymenty uzupełnione były badaniami *ex vivo* biodystrybucji i efektywności terapeutycznej.

Rozdział 4 pracy o objętości 45 stron został poświęcony otrzymanym wynikom oraz ich dyskusji. Rozpoczyna się on od prezentacji wyników prowadzonych syntez i badania koniugatów nanocząstek złota z DOX i Tmab. Podczas omawiania trwałości otrzymywanych koniugatów nanocząstek, np. z doksorubicyną, zostało podane, że układy te są stabilne i nie obserwuje się uwalniania leku w roztworach o zadanych pH (str. 79). Nasuwa się tutaj pytanie o limit oznaczania DOX w stosowanej do tego celu metodzie mając na względzie możliwość desorpcji tego związku z powierzchni AuNPs.

Otrzymane biokoniugaty były badane pod kątem ich stabilności, co prezentuje wykres 4.2.. Na jego osi rzędnych widnieje podpis, że jest to zmiana średnicy hydrodynamicznej podana w %. Czy tuż po syntezie (dzień 0) zmiana ta wyniosła 100%, czy też otrzymane wyniki powinny być



odniesione do wielkości cząstek z dnia 0? Podobny podpis osi widnieje także na rys. 4.26, na stronie 106.

Interesujące wyniki otrzymane zostały dla porównania aktywności metabolicznej komórek SKOV-3 i MDA-MB-231. Część z analizowanych układów charakteryzowała się istotnie statystyczne różnymi wynikami przy znaczącej wartości parametru p . Największy spadek zaobserwowano dla „czystej” DOX. Kolejne badania były poświęcone analizie apoptozy w populacji komórek w kontakcie z syntezowanymi biokoniugatami. Uzyskane wyniki wskazały na istnienie widocznego efektu działania w układach DOX- $^{198}\text{AuNP-Tmab}$ (dla 20 MBq/ml) oraz $^{198}\text{AuNP-T-DM1}$.

Warto odnotować, że współczesne badania prowadzone są coraz częściej na hodowlach trójwymiarowych, które zdecydowanie lepiej oddają efekty obserwowane w tkankach. W tym celu Doktorantka przeprowadziła szereg badań z wykorzystaniem sferoidów. Analiza otrzymanych wyników wskazała na znaczącą redukcję ich rozmiarów poddanych działaniu DOX- $^{198}\text{AuNP-Tmab}$. Nie są dla mnie jasne podane w tekście na stronie 94 ich wartości (111 065 310 oraz 65 763 589 μm^2). Jaki jest ich związek z tymi zaprezentowanymi na rysunku 4.13?

Ważne wyniki otrzymano dla biodystrybucji jednego z ww. biokoniugatów. Wskazały one, że układ ten nie może być podawany systemowo, gdyż gromadzi się w wątrobie i śledzionie. Celowym jest zatem jego podanie bezpośrednio do zmiany nowotworowej.

Kolejne serie pomiarów wykonano dla koniugatów AuNP-T-DM1 . Doktorantce udało się z zadowalającą wydajnością przeprowadzić syntezę wspomnianych układów. Na stronie 105 pojawia się informacja, że ekstrapolacja otrzymanych wyników dla bardzo niskich stężeń T-DM1 nie jest prawidłowym rozwiązaniem. Nasuwa się pytanie: Dlaczego?

Kolejne badania nad zsyntezowanymi koniugatami dotyczyły określenia ich cytotoksyczności. Przeprowadzone zostały one także na sferoidach. Otrzymane wyniki wskazały na znaczące zmniejszenie ich rozmiarów po tygodniowej terapii $^{198}\text{AuNP-T-DM1}$.

Na uwagę zasługuje fakt, że w recenzowanej pracy uzyskane wyniki są konfrontowane z danymi literaturowymi uzyskanymi przez inne grupy badawcze wykazując silniejszy efekt terapeutyczny jak w przypadku $^{198}\text{AuNP-T-DM1}$ vs. T-DM1.

Pracę zamyka rozdział 5 będący podsumowaniem wraz z wnioskami płynącymi z otrzymanych wyników.

Przygotowując rozprawę doktorską nie sposób uniknąć drobnych błędów edytorskich lub językowych. Nie umniejszają one jednak mojej wysokiej oceny pracy.



str. 39 – ^{213}Bi i ^{226}Th

str. 44 – ostatnie zdanie drugiego akapitu: „...które stwarza stosowania konwencjonalnych leków [104,105].”

str. 46 – drugi akapit: „...dendrymery, składające się...” oraz trzeci akapit: „...m.in. W diagnostyce HIV...”

str. 49 – pojawia się pewny skrót myślowy podczas omawiania syntezy nanocząstek Au z roztworów kwasu chlorozłotowego w postaci redukcji jonów Au^{3+} a nie form skompleksowanych

str. 50 – trzeci akapit: „konjiugacji”

str. 53 – „cząsteczek α ” oraz „ β - 0 energii”

str. 56 – ostatni akapit: „...wykorzystywany jest np. W terapiach...”

str. 61 – w opisie spektrofotometrii UV-Vis widnieje odwołanie do podrozdziału 3.3.3.2 a zapewne chodziło o podrozdział 3.3.4.3

str 104- w tekście widnieje informacja będąca zapewne skrótem myślowym dotycząca wydajności przyłączania T-DM1 do nanocząstek złota w zależności od dodanego stężenia.

str. 105 – pierwszy akapit: „przyłączenia T-DM1”

str. 111 – „Kadcyl[®] w połączeniu”

Podsumowanie i Wnioski

Po zapoznaniu się z przedłożoną do recenzji pracą doktorską Pani mgr Kingi Żelechowskiej-Matysiak stwierdzam, że zawiera ona przejrzysty wstęp teoretyczny oraz czytelny opis przeprowadzonych eksperymentów. Rozprawa ta zawiera elementy nowości naukowej dotyczące syntezy nowych radiobiokoniugatów z przyłączonymi chemioterapeutykami. Opisanie w rozprawie wyniki badań wskazują, że Pani Żelechowska-Matysiak posiada bogate doświadczenie w pracy z aktywnymi biologicznie preparatami oraz izotopami radioaktywnymi. Zaprezentowana w rozprawie dyskusja wyników oraz współautorstwo 2 opublikowanych artykułów naukowych świadczą o dobrym przygotowaniu do prowadzenia dalszych badań naukowych.

Powyższe osiągnięcie naukowe spełnia wymagania określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce.



Praca z materiałami promieniotwórczymi i biologicznymi wymaga od eksperymentatora dużych kompetencji. Otrzymane wyniki są nowatorskie i dotyczą nowych radio- i chemoterapeutyków zawierających złoto-198. Zostały one opracowane statystycznie a także przedstawione na szeregu wykresach zawartych w pracy. Uwzględniając ich wysoki poziom oraz szeroki zakres prowadzonych prac, wnioskuję o wyróżnienie pracy Pani mgr Kingi Żelechowskiej-Matysiak.

Mając na uwadze powyższe przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Kingi Żelechowskiej-Matysiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marek Chochowski