

Dr hab. n. med. Dorota Słonina, prof. NIO  
Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów  
Narodowy Instytut Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie  
PIB, Oddział w Gliwicach  
[dorota.slonina@io.gliwice.pl](mailto:dorota.slonina@io.gliwice.pl)

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Drzał  
pt. „Wykorzystanie mikropęcherzyków tlenu do walki z hipoksją  
w guzach nowotworowych”**

1. Wartość naukowa rozprawy - trafność podjętej tematyki badawczej i jej oryginalność

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy aktualnego i ważnego problemu terapeutycznego jakim jest hipoksja komórek nowotworowych. Niedotlenowanie komórek w guzie nowotworowym prowadzi bowiem do oporności na leczenie promieniowaniem o niskiej gęstości jonizacji (o niskim wsp. LPE - liniowego przekazywania energii) i chemiczne oraz zwiększa ryzyko powstawania przerzutów.

Hipoksja jest uznanym niekorzystnym czynnikiem prognostycznym dla przeżyć całkowitych i bezobjawowych w leczeniu napromienianiem, chemicznym i chirurgicznym wielu typów nowotworów złośliwych. Szczególnie niekorzystną rolę w odpowiedzi na leczenie odgrywają komórki nowotworowe przystosowane do życia w warunkach hipoksji, dlatego że komórki te mogą oddychać beztlenowo, a zdobytą podczas glikolizy energię wykorzystywać do proliferacji, powodując wzrost i progresję nowotworu. Pomimo prognostycznego znaczenia wielu markerów hipoksji, pomiar hipoksji w guzach nie jest stosowany w codziennej praktyce klinicznej, głównie z powodu inwazyjności elektrod oraz niezdolności do dokładnego określenia i wycelowania w obszar hipoksji w nowotworze, zwłaszcza że w trakcie radioterapii z powodu reoksygenacji rozmiar i miejsca hipoksji ulegają zmianom. Z tego też powodu nawet nieinwazyjne obrazowanie obszarów hipoksji np. techniką PET nie jest powszechnie stosowane, ze względu na wysokie koszty PET jakie należałoby ponieść chcąc wielokrotnie w

trakcie radioterapii obrazować zmieniające się obszary hipoksji i na tej podstawie eskalować dawkę promieniowania na dany obszar (koncepcja „dose painting”).

Od czasu odkrycia efektu tlenowego, zmniejszenie hipoksji uznawano za jeden z warunków zwiększenia promieniowrażliwości komórek nowotworowych i w konsekwencji zwiększenia skuteczności radioterapii. Niestety pomimo licznych prób pokonywania hipoksji, żaden z klinicznie testowanych dotychczas sposobów modulowania hipoksji (oddychanie tlenem hiperbarycznym, terapia ARCON z karbogenem i nikotynamidem, stosowanie uwrażliwaczy lub cytotoksycznych związków bioredukcyjnych) nie wszedł do powszechnej praktyki klinicznej. Dlatego też poszukiwanie i testowanie innych strategii pokonywania hipoksji jest nadal pożądanym przedmiotem badań.

Doktorantka w swojej pracy postanowiła do modulowania hipoksji wykorzystać mikropęcherzyki tlenu (OBM) wrażliwe na ultradźwięki i zbadać ich skuteczność w dostarczaniu tlenu do guzów nowotworowych (mysiego nowotworu piersi 4T1) oraz ich wpływ na skuteczność radioterapii. Mikropęcherzyki tlenu są wykorzystywane w praktyce klinicznej jako ultrasonograficzne środki kontrastowe. Są też przedmiotem badań jako nośniki do dostarczania leków. Zatem zaproponowany temat badań dobrze wpisuje się w aktualne kierunki badań biomedycznych. Jest też oryginalny, biorąc pod uwagę fakt, że w literaturze istnieje tylko 5 doniesień dotyczących wpływu połączenia mikropęcherzyków tlenu z radioterapią, ale z wykorzystaniem innych modeli nowotworowych i dawek promieniowania.

## 2. Wartość merytoryczna rozprawy

W części wstępnej rozprawy Doktorantka umiejętnie wprowadza czytelnika w tematykę badawczą. Dokładnie omawia zagadnienie hipoksji nowotworowej, w tym rodzaje hipoksji i ich wpływ na molekularne mikrośrodowisko guza oraz potencjalne znaczenie w praktyce klinicznej, czyli wpływ hipoksji na skuteczność chemioterapii, immunoterapii, terapii fotodynamicznej i sonodynamicznej i co najważniejsze radioterapii. Następnie omawia sposoby pokonywania hipoksji w nowotworach, w tym rolę mikropęcherzyków tlenu i zasadę ich działania. W kolejnej części wstępu autorka bardzo dokładnie opisuje metody oceny hipoksji w nowotworach. Wstępna część pracy napisana jest spójnie i czyta się ją bardzo dobrze. Drobne uwagi do tej części pracy przedstawiam poniżej w pkt. Uwagi.

Cel główny oraz cele szczegółowe pracy zostały sformułowane bardzo precyzyjnie i konsekwentnie zrealizowane o czym świadczy zawartość dalszej części pracy.

Metodyka badań została właściwie dobrana do realizacji zamierzonych celów i opisana szczegółowo i zrozumiale. Jestem pod wrażeniem ilości zastosowanych przez doktorantkę metod badawczych i ogromu wykonanej pracy. Autorka w pierwszej kolejności dokonała charakterystyki wielkości mikropęcherzyków z wykorzystaniem analizy mikroskopowej oraz analizatora wielkości cząstek Zetasizer Nano S. Następnie jako pierwsza oceniła kinetykę uwalniania tlenu w roztworze za pomocą tlenometrii EPR. W kolejnym etapie Autorka sprawdziła wpływ mikropęcherzyków tlenu na utlenowanie guzów nowotworowych z zastosowaniem spektroskopii EPR do punktowego pomiaru tlenu, obrazowania EPR (również po raz pierwszy) oraz obrazowania fotoakustycznego nasycenia hemoglobiny tlenem. Równolegle oceniła wpływ OBM w guzie na poziom białek i genów związanych z hipoksją metodą western blot i qPCR, oraz wpływ OBM na unaczynienie i perfuzję guzów nowotworowych metodami immunohistochemii. Co niezwykle istotne sprawdziła także wpływ podawania mikropęcherzyków tlenu na tkanki prawidłowe serca, nerki i wątroby.

Wyniki powyższych testów pozwoliły na przeprowadzenie najciekawszych badań z praktycznego punktu widzenia, mianowicie sprawdzenie wpływu mikropęcherzyków tlenu na skuteczność radioterapii.

Wszystkie wyniki przedstawiono w sposób bardzo logiczny i jasny. Wyniki udokumentowano starannie przygotowanymi wykresami i obrazami. Na uwagę zasługuje fakt, że omówienie poszczególnych wyników kończyło się jedno lub dwuzdaniowym podsumowaniem, co bardzo ułatwiało podążanie za wynikami kolejnych etapów pracy.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania wykazały, że mikropęcherzyki tlenu wydajnie dostarczają tlen do guza nowotworowego i prowadzą do zwiększenia skuteczności radioterapii obserwowanej w postaci spowolnienia wzrostu guza. Niestety „ciemną stroną” terapii OBM okazały się efekty kawitacyjne w rejonie naczyń krwionośnych prowadzące do większego rozsiewu komórek nowotworowych, co na tym etapie badań dyskwalifikuje ich kliniczne zastosowanie. Uzyskany wynik, chociaż rozczarowujący jest ważnym osiągnięciem badawczym. W dyskusji Doktorantka podeszła bardzo dojrzałe do tak negatywnego wyniku (zaobserwowanego po raz pierwszy) i w konfrontacji z raportami innych autorów przedstawiła możliwe uzasadnienie. O dojrzałości Autorki świadczy również fakt, że nie poddając się przedstawiła perspektywy dalszych badań. Rozprawę kończy rozdział zawierający wszystkie wnioski wynikające z pracy.

### 3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska ma formę monografii liczącej 146 stron i zawiera wszystkie wymagane elementy typowe dla oryginalnych prac badawczych. Szata graficzna jest atrakcyjna. Praca zawiera 30 rycin i 8 tabel. Uwagę zwraca strona edytorska. Praca została przygotowana niezwykle starannie, przejrzysto i poprawnie stylistycznie. Piśmiennictwo obejmuje 274 pozycje, w większości opublikowanych w latach 2010 - 2020, stanowiące przegląd aktualnej literatury dotyczącej omawianej tematyki. Oprócz jednej wszystkie prace opublikowano w języku angielskim. Nie mam zastrzeżeń do strony formalnej pracy.

### 4. Uwagi

Z obowiązku recenzenta przedstawiam poniższe uwagi merytoryczne, które nie umniejszają wartości pracy i nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę.

1. We wstępie, w pkt. 3.1. Hipoksja nowotworowa, Autorka napisała, że „obecność hipoksji wewnątrz guza jest niezależna od jego wielkości”. Jest to nieprawdziwe stwierdzenie, ponieważ guzy o średnicy  $< 1\text{mm}$  są w pełni utlenowane. Obszary hipoksji zaczynają pojawiać się w guzie wraz z jego wzrostem, gdy guz nie nadąża z tworzeniem naczyń krwionośnych w procesie angiogenezy (*Joiner and Van der Kogel Basic Clinical Radiobiology 2019 str. 191*).
2. Na str. 23. w pkt. 3.2.4. Radioterapia, Doktorantka omówiła efekt tlenowy i wpływ hipoksji na promieniowrażliwość komórek nowotworowych wyrażany współczynnikiem wzmożenia tlenowego (WWT). W swoim opisie Autorka zapomniała zaznaczyć, że WWT zależy od rodzaju promieniowania i maleje wraz ze wzrostem wsp. liniowego przekazywania energii (LPE). Zatem wartość  $\text{WWT} = 2,5 - 3$  dotyczy tylko komórek napromienianych promieniowaniem o niskim LPE np. fotonowym i protonowym. Dla porównania WWT dla neutronów prędkich wynosi 1,6, a dla jonów węgla, czy cząstek alfa  $\text{WWT} = 1$ , co oznacza, że skutki biologiczne takiego promieniowania w niewielkim stopniu zależą od stopnia utlenowania komórek nowotworowych (*Joiner and Van der Kogel Basic Clinical Radiobiology 2019 str. 56*).
3. W części wstępnej rozprawy zabrakło mi informacji nt zjawiska reoksygenacji. Jest to jeden z 5 podstawowych procesów biologicznych tzw. 5R radioterapii decydujących o odpowiedzi nowotworu i tkanek prawidłowych na frakcjonowaną radioterapię. Reoksygenacja jest bardzo korzystnym zjawiskiem zachodzącym w czasie

frakcjonowanej radioterapii przyczyniającym się do poprawy utlenowania komórek nowotworowych i wzrostu ich promieniowrażliwości. Bez tego zjawiska w radioterapii frakcjonowanej kolejne dawki frakcyjne skutkowałyby mniejszym efektem letalnym.

4. W rozdziale 3.3. Doktorantka omówiła sposoby walki z hipoksją, skupiając się jedynie (prawdopodobnie ze względu na temat swojej pracy) na metodach związanych ze zwiększeniem dostawy tlenu do guzów. Dobrze byłoby wspomnieć, że metody walki z hipoksją możemy podzielić na 3 strategie, których celem jest albo zwiększenie utlenowania komórek, albo uwrażliwienie komórek za pomocą radioczulaczy lub temperatury (hipertermia), albo zabicie komórek hipoksycznych przy pomocy cytotoksycznych związków bio redukcyjnych (np. tirapazaminy). Również testowane były związki, których celem było zniszczenie sieci naczyń w nowotworze (VDAs). Niestety nie da się ukryć, że wszystkie testowane dotychczas strategie zawiodły.
5. W części 5. Materiały i Metody w rozdziale 5.6.6. Radioterapia, Autorka napisała „*Densytometria wykonana była przez pracowników Zakładu Badań Radiacyjnych i Radioterapii Protonowej IFJ...*”. Z pewnością chodziło o wykonaną dozymetrię, a nie densytometrię.
6. Obrazowanie fotoakustyczne i analizę ekspresji genów techniką qPCR wykonano w laboratorium we Francji. Nie jest jasne, czy Doktorantka brała udział w tych analizach, czy zostały one wykonane w całości przez wspomnianą mgr Gabrielę Dziurman?

## 5. Ocena końcowa

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani Agnieszki Drzał stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, a jej zawartość merytoryczna i bardzo staranny sposób przedstawienia wyników świadczą o dojrzałości naukowej Doktorantki. Rozprawa spełnia warunki stawiane pracom na stopień doktora określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Agnieszki Drzał do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.