



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wrocław 09.09.2022

Dr hab. inż. Julita Kulbacka, prof. UMW
Katedra i Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich
ul. Borowska 211A, 50-556 Wrocław
email: julita.kulbacka@umw.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ewy Kowolik

pt.: „*AGuIX® theranostic nanoparticles for vascular-targeted interstitial photodynamic therapy of brain tumor*”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Ewy Kowolik została wykonana w Zakładzie Biofizyki i Biologii Nowotworów, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Martynty Elas oraz prof. Patrycji Nowak-Śliwińskiej z Zespołu Farmakologii Molekularnej Uniwersytetu Genewskiego.

Tematyka rozprawy doktorskiej skupia się na możliwości zastosowania terapii fotodynamicznej (PDT) w leczeniu nowotworów mózgu. Rozprawa doktorska mgr Ewy Kowolik znakomicie wpisuje się w nurt badań poświęconych terapiom przeciwnowotworowym, wśród których jak sama Doktorantka zauważa, leczenie glejaka wciąż jest wyzwaniem. Odpowiedzią na te poszukiwania może być właśnie metoda fotodynamiczna, która na chwilę obecną jest dość dobrze poznana, jednak wciąż nie stanowi terapii pierwszego wyboru. Na pierwszym miejscu spośród wachlarza terapii glejaka jest chirurgia, potem chemio- i radioterapia. Doktorantka uplasowała swoje badania i wyniki w doskonałej niszy naukowej. Autorka zaproponowała standardowy model *in vitro* oraz ciekawy model *in vivo* na modelu zarodka kurzego i modelu mysim. Model guza rosnącego na błonie omocznioowo-owodniowej (CAM) zarodka kurzego jest stosunkowo nieczęsto stosowany na korzyść modeli szczurzych i mysich. Takie podejście umożliwia pokonanie wielu ograniczeń w badaniu terapii przeciwnowotworowych. Błona kosmówkowo-omocznioowa daje doskonałe możliwości wspomagania rozwoju komórek nowotworowych m.in. proliferacji, inwazji czy karcynogenezy. Na uwagę zasługuje fakt, że praca została zrealizowana w oparciu o projekt EuroNanoMed II, oraz we wsparciu drugiego promotora z Uniwersytetu Genewskiego. Chciałabym również zwrócić uwagę na postawę Doktorantki, jaka

przejawia się w niezwykle „Podziękowaniach”, sprawia wrażenie osoby chętnie podejmującej współpracę, docenia okazaną pomoc oraz wsparcie naukowe doświadczonych mentorów, z którymi miała okazję pracować.

Rozprawę rozpoczyna jednostronicowy wykaz skrótów, ułatwiający czytelnikowi rozszyfrowanie stosowanej przez Doktorantkę terminologii. Praca na wstępie zawiera streszczenie zarówno w języku polskim jak i angielskim, które w zwięzły sposób wprowadzają do zagadnień podejmowanych w dysertacji. Uzupełniającym dodatkiem jest streszczenie graficzne wizualizujące koncepcję pracy i jej wykonanie. Całość rozprawy jest opracowana w języku angielskim, co zwiększa grono jej odbiorców. Dysertacja ma klasyczny układ obejmujący Wprowadzenie, Cele, Materiały i metody badawcze, Wyniki, Dyskusję, Wnioski i Perspektywy.

Praca stanowi wyczerpujące, bogato ilustrowane opracowanie naukowe zawarte na 103 stronach. We wstępie Autorka zawarła przegląd literaturowy dotyczący problematyki glejaka wielopostaciowego, jego epidemiologii, ryzyka zapadalności i metod leczenia. Autorka zaznacza również, że prowadzone są terapie doświadczalne, pomiędzy którymi znajduje swoje miejsce terapia fotodynamiczna. Ważkim zagadnieniem jest mikrośrodowisko guza, które jest nie bez znaczenia, jeśli chodzi o potencjał metastatyczny. Autorka słusznie zaznacza celowość terapii skierowanej na poszczególne elementy tego mikrośrodowiska. W kolejnym rozdziale Doktorantka skupia się na zagadnieniu terapii fotodynamicznej, jej fotochemicznych i fotofizycznych aspektach, oraz zastosowaniu PDT w różnych zmianach chorobowych, nie tylko nowotworowych. W rozdziale tym Autorka zaznacza składowe PDT (fotouczulacz, tlen, światło o odpowiedniej długości fali) oraz od czego zależy skuteczność samej terapii. Kolejny rozdział jest poświęcony PDT w kontekście celowanej terapii w unaczynienie guza. Nowotwory mają doskonale wykształcone mechanizmy intensywnych procesów powstawania naczyń, Autorka doskonale zaprezentowała na Figurze 5, jak guz wysyła odpowiednie sygnały w kierunku naczyń, aby te kierowały swój wzrost w jego kierunku. Zatem, taka lokalna terapia antyangiogenna działająca na nowopowstałe naczynia mogłaby stanowić doskonałą alternatywę w przypadku nowotworów o wysokim potencjale przerzutowania. W tym zakresie Doktorantka wskazuje jakie są możliwości terapii fotodynamicznej i na jakich modelach warto oceniać efektywność PDT. Na tym etapie, nieco myląca jest numeracja figur we Wstępie, na str. 25 pojawia się kolejna figura nr 3, do której Autorka nie odnosi się w rozprawie. W dalszym etapie mgr Kowolik opisuje potencjalny mechanizm, niszczącego działania PDT na naczynia guza, zależny od reaktywnych form tlenu. Tu na str. 26 pojawia się odniesienie do Fig.8, domyślam się, że może chodzić o Fig. 4 na str. 27. Doktorantka wskazuje dwa podejścia w wykorzystaniu PDT ukierunkowanej na niszczenie unaczynienia guza, a mianowicie: pośrednie i bezpośrednie. Częściej używaną terminologią jest pasywne i aktywne ukierunkowane naczyniowe działanie PDT, gdzie o działaniu aktywnym mówimy, gdy związki fotouczulające selektywnie gromadzą się w składnikach neowaskularnych, wywołując w ten sposób preferencyjną odpowiedź naczyniową. Natomiast celowanie pasywne może być osiągnięte, gdy wstrzyknięty fotouczulacz jest głównie dystrybuowany w naczyniach krwionośnych,

osiągając szczytowe stężenie w osoczu i zapewnia okno terapeutyczne w leczeniu naczyń. W tym miejscu pracy jest odniesienie do Fig.9, która jest błędnie oznaczona jako figura 5 (str. 29).

W kolejnym rozdziale Doktorantka formułuje nadrzędny cel jakim było zbadanie efektywności terapii fotodynamicznej z zastosowaniem fotouczulacza AGuIX® wobec modelu glejaka wielopostaciowego. Dalej przedstawiono trzy szczegółowe problemy badawcze: (1) zbadanie efektywności PDT z fotouczulaczem AGuIX® na komórkach glejaka, endotelialnych oraz modelu 3D glejaka; (2) ocena efektu PDT z AGuIX® na modelu guza rosnącego na błonie omocniowo-owodniowej i modelu mysim; oraz (3) optymalizacja metody PDT na ortotopowym mysim modelu do aplikacji śródmiąższowej.

Rozdział poświęcony metodyce obejmuje opis materiału biologicznego komórkowego i zwierzęcego, jego przygotowanie do doświadczeń oraz zastosowane techniki doświadczalne. Pierwszy opis dotyczy fotouczulacza AGuIX®, stosowanego do terapii w niniejszej rozprawie. Autorka podaje, że fotouczulacz został zsyntezowany grupą współpracującą, podając odniesienie do literatury. W tym punkcie można by było zobrazować strukturę fotouczulacza, sposób jego upakowania w nanocząstkach, rozmiar nanocząstek oraz potencjał zeta. Słusznie zastosowano w badaniach kontrolę do peptydu ukierunkowanego na neuropilinę 1. Obiektem badań były ludzkie komórki glejaka wielopostaciowego (U87-MG), mysie komórki glejaka (GL-261) oraz unieśmiertelnione komórki endotelialne (EC-RF24). Tutaj zabrakło w opisie, że jest to również linia ludzka.

W dalszej części możemy zapoznać się z metodami badawczymi *in vitro*, m.in. optymalizacją warunków hodowli 2D i 3D, analizą wychwytu fotouczulacza przez komórki i oceną aktywności metabolicznej, która posłużyła do oceny foto- i cytotoksyczności. W przypadku oceny wychwytu fotouczulacza pojawia się pytanie, dlaczego zastosowano tylko jedno stężenie 5µM? Co było motywem tego wyboru?

W dalszym etapie Doktorantka oceniała w komórkach zmiany morfologiczne, znakując fluorescencyjnie F-aktynę i jądra komórkowe. Ponadto, na modelu *in vitro* wykonano jeszcze barwienie błękitem trypanu oraz znakowanie żywych i martwych komórek kalceiną i homodimerem etydyny. Kolejny rozdział metodyki obejmuje opis procedury PDT na błonie omocniowo-owodniowej (CAM) zarodka kurzego oraz na mysim modelu. Autorka do oceny modelu *in vivo* wykorzystwała obrazowanie dopplerowskie oraz spektroskopię EPR. Ostatnim etapem doświadczeń było wykonanie protokołu PDT na ortotopowym mysim modelu oraz śródmiąższowe zastosowanie metody PDT. W tym ostatnim badaniu, do analizy wykorzystano obrazowanie rezonansem magnetycznym. W opisie metodyki zabrakło podania liczebności badanej grupy, zarówno w przypadku modelu CAM jak i myszy. Dobranie odpowiedniej liczby osobników umożliwi zachowanie poprawności doświadczeń i wykonanie analizy statystycznej.

Następną częścią rozprawy są Wyniki. Ocena akumulacji fotouczulacza w komórkach pokazuje podobną tendencję w obu liniach komórkowych, z tym, że komórki glejaka po 12h mają zauważalnie wyższą intensywność fluorescencji. Ocena foto- i cytotoksyczności pokazuje, że w ciemności

fotouczulacz jest bezpieczny, dopiero po naświetlaniu wykazuje oczekiwane fotocytotoksyczne działanie. Tu warto zaznaczyć, że ta efektywność była znacznie wyższa w przypadku komórek ECFR. Wyniki barwienia błękitem trypanu pokazują komórki kontrolne zestawione z komórkami poddanymi PDT. Tu warto pokazać również tzw. kontrole ciemne z fotouczulaczem, bez naświetlania. Dodatkowo warto policzyć procent komórek wybarwionych w odniesieniu do całości populacji co da dodatkowy wynik, który będzie można odnieść do pozostałych testów.

W przypadku analizy morfologii komórek przy pomocy znakowania F-aktyny i jąder komórkowych, również warto dodać obrazowanie komórek kontrolnych z fotouczulaczem bez naświetlania. Niestety wydruk przedstawiony mi do oceny nie pozwala na analizę tych zmian, w przypadku komórek kontrolnych ECRF, sygnał zielonej fluorescencji pochodzący od F-aktyny jest właściwie niewykrywalny. Aby ułatwić czytelnikowi zadanie, warto wykonać analizę obrazów przy pomocy dowolnego oprogramowania np. ImageJ. Analiza sygnału fluorescencyjnego oraz jego dystrybucji dostarczy mierzalnych danych.

Kolejny etap doświadczalny dostarczył wyników przeprowadzonych na sferoidach komórek U87. Doktorantka uzyskała obiecujące wyniki, obserwujemy spadek aktywności metabolicznej wraz ze wzrostem stężenia fotouczulacza oraz dawki światła. Otrzymane dane potwierdzają się również po analizie „live/death” i obserwujemy widoczny wzrost czerwonej fluorescencji po terapii świadczące o śmiertelności komórek. Dalszy etap dotyczy już badań *in vivo*. Autorka pokazuje, że metoda „wiszącej kropli” w porównaniu do komórek w zawieszynie i kolejno podawanych do jaja, pozwalała na uzyskanie guza o większej objętości. Otrzymane wyniki wskazują, że terapia przeprowadzona na tym modelu już po 12 dniach powodowała znaczne zahamowanie wzrostu guza. Podobnie obiecujące wyniki uzyskano na mysim modelu, jednak nie dla wszystkich traktowanych zwierząt. Doktorantka wskazuje, że część leczonych osobników zareagowała na terapię a część nie. Spostrzeżono ok. 50% zahamowanie wzrostu guza u połowy osobników. W tym celu dokonano analizy funkcjonalności naczyniowej metodą obrazowania dopplerowskiego w guzach które reagowały na PDT i tych, które nie reagowały na PDT. Wyniki jednoznacznie wskazują na niski stopień unaczynienia guzów, które nie reagowały na PDT, co może tłumaczyć słabszy efekt terapeutyczny. Badanie natlenienia tkanki guza pokazuje nieznaczny spadek po PDT w przypadku guzów odpowiadających na PDT, natomiast guzy nie reagujące na PDT wykazywały wzrost natlenienia. Należy też zauważyć, że wyjściowy poziom przed terapią był znacząco niski, również w odniesieniu do kontroli naświetlanej.

Finalną częścią wyników są dane dotyczące terapii przeprowadzonej na mysim modelu glejaka, tym razem rosnącego w mózgu. Autorka pokazuje czas wzrostu guza po podaniu komórek U87 oraz GL-261. Wyniki zaopatrzone również grafiką pokazującą technikę podawania komórek. W przypadku tego protokołu, fotouczulacz podano dożylnie, natomiast naświetlanie przeprowadzono śródmiąższowo. Autorka dość skromnie opisała wyniki tej fazy badań, pokazuje tylko dwie fotografie z tej terapii, z czego jedna wykonana po 24 po PDT, więc odczuwam tu pewien niedosyt. Warto dodać wyniki po dłuższym czasie obserwacji. Częściowe i dodatkowe wyniki Autorka umieściła w rozdziale

„Appendix”, jednak do tych wyników się nie odnosi w rozdziale „Wyniki”. Te dane mogły znaleźć swoje miejsce również w części reprezentującej większość wyników, nie zaburzając struktury pracy.

W dalszej części rozprawy Doktorantka prowadzi dyskusję, odnosząc się do aktualnych danych literaturowych. Autorka podzieliła ten rozdział na siedem mniejszych podrozdziałów dotyczących poszczególnych metod badawczych. W rozdziale tym zamieszczono również dodatkowe wykresy, m.in. prezentujące wydajność kwantową badanego fotouczulacza. Czy te badania również zostały wykonane przez Autorkę pracy, czy są zaczerpnięte z zewnętrznych źródeł?

Pracę Doktorantki wieńczą trzy wnioski, w których wskazano efektywną akumulację fotouczulacza w nośnikach obu typach badanych komórek. Fotouczulacz wykazywał aktywność fotodynamiczną co wykazano w badaniach biologicznych. Wyniki z badań *in vivo* potwierdziły aktywność stosowanego nanoukładu w terapii fotodynamicznej. Ciekawą i wartościową obserwacją jest zmniejszenie unaczynienia w guzach odpowiadających na zadane warunki terapii fotodynamicznej. W ostatnim punkcie Autorka podsumowuje badania optymalizacji metody PDT na ortotopowym mysim modelu. Ta faza badań umożliwiła Badaczce opracowanie protokołu zaszczepiania komórek w celu osiągnięcia oczekiwanego wzrostu guzów. Autorka opracowała również protokół pozwalający na przeprowadzenie PDT śródmiąższowo. Jak taka strategia terapeutyczna mogła by zostać transponowana na badania kliniczne?

W ostatnim, zwięzłym rozdziale „Perspektywy” Autorka przedstawia dalsze możliwości wykorzystania proponowanego układu badawczego i otrzymanych wniosków. Czy te perspektywy dotyczą kolejnych etapów badawczych Doktorantki, czy są ogólnymi wskazaniem dla potencjalnych odbiorców pracy?

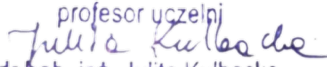
Doktorantka zastosowała szeroki warsztat badawczy, na szczególną uwagę zasługuje dobór modeli badawczych. Stwierdzam, że Autorka rozprawy podeszła do realizacji postawionego sobie celu kompleksowo. Rozprawa doktorska, jest napisana dojrzałym językiem naukowym i zaopatrzona w starannie dopracowane schematy. Z obowiązku recenzenta, muszę jednak zwrócić uwagę na pewne niejasności, które znalazłam w tekście pracy:

- opis metodologii wymaga drobnych uzupełnień co zaznaczono w recenzji;
- w tekście napotyka się drobne błędy edytorskie w postaci brakujących spacji czy też nadmiarowych pustych linii (przykładowo str.11, 26, 33);
- pojawiły się błędy w numeracji figur na stronach 25-29;
- bogata szata graficzna nie posiada odnośników literaturowych, na bazie których przygotowano ryciny do rozprawy;
- warto dodać osiągnięcia naukowe Autorki rozprawy, tzw. CV naukowe.

Są to oczywiście niedociągnięcia nie mające cech obniżających wartość pracy, a więc nie mogą mieć wpływu na moją końcową ocenę. Przedstawiona mi do recenzji praca potwierdza, że Doktorantka posiada systematyczną wiedzę z zakresu tematyki pracy doktorskiej, potrafi analizować swoje wyniki, zgodnie z aktualnym stanem wiedzy.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa Pani mgr Ewy Kowolik pt.: **”AGuIX® theranostic nanoparticles for vascular-targeted interstitial photodynamic therapy od brain tumor”** spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami).

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Ewy Kowolik do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Mając na uwadze nowatorski charakter badań oraz ich kompleksowość, sposób prezentacji wyników, wartości poznawcze otrzymanych wyników oraz dociekliwość naukową Doktorantki jaką można zauważyć w przedłożonej do recenzji pracy, wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII
MOLEKULARNEJ I KOMÓRKOWEJ
profesor uczelni

dr hab. inż. Julita Kulbacka

dr hab. inż. Julita Kulbacka, prof. UMW