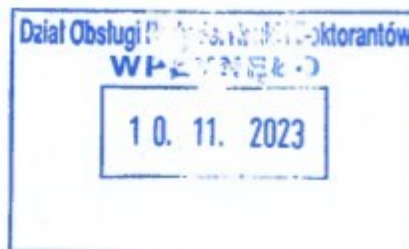


prof. dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Chemii
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitik
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń



Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Emilii Balcer zatytułowanej
*Badania nad wybranymi metodami potencjalnie poprawiającymi skuteczność terapeutyczną
4-borono-L-fenylalaniny w terapii borowo-neutronowej*

Doktorat był realizowany w Zakładzie Chemii Leków, Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem naukowym dwóch Pań promotor - dr hab. Joanny Giebułtowicz i prof. dr hab. Ewy Bulskiej oraz przy dodatkowym wsparciu Pani dr Moniki Sobiech, która pełniła rolę promotora pomocniczego. Praca doktorska była częścią projektu Interdyscyplinarnego Studium Doktoranckiego *Radiofarmaceutyki dla ukierunkowanej molekularnie diagnostyki i terapii medycznej, RadFarm*. Projekt ten został sfinansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju pod numerem POWR.03.02.00-00-I009/17.

Ocena wyboru tematyki badawczej

Choroby nowotworowe to ogromne wyzwanie dotyczące zdrowia publicznego na całym świecie. Poszukiwanie skuteczniejszych metod leczenia nowotworów jest nie tylko istotne z medycznego punktu widzenia, ale również ma ogromne znaczenie społeczne i ekonomiczne. Dlatego badania nad potencjalnymi, alternatywnymi terapiami, takimi jak terapia borowo-neutronowa (*Boron Neutron Capture Therapy - BNCT*) są bardzo istotne. Jest to niewątpliwie obiecująca technologia, która ma potencjał w leczeniu nowotworów, zwłaszcza tych trudnych do wyleczenia lub o trudno dostępnej lokalizacji. Wyniki wstępnych badań wskazują, że BNCT może być skuteczniejsze niż niektóre tradycyjne metody leczenia nowotworów. Jednym z kluczowych ograniczeń w terapii BNCT jest brak odpowiedniego nośnika boru. Dlatego istnieje pilna potrzeba badań nad nowymi nośnikami i metodami dostarczania boru do komórek nowotworowych, co może zwiększyć efektywność tej terapii. Opracowanie takich nośników i nowych metod pomiaru stężenia boru w pojedynczej komórce za pomocą spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną (SC-ICP-MS) może skutkować dokładniejszą oceną efektywności terapii i lepszym zrozumieniem dystrybucji leku w organizmach pacjentów. Uważam, że wybór tematyki badawczej przez Panią mgr Emilię Balcer dotyczącej zastosowania nowoczesnych materiałów polimerowych (*Molecularly Imprinted Polymers - MIPs*) i 4-borono-L-fenylalaniny (BPA) w medycynie, jest w pełni uzasadniony i aktualny ze względu na znaczenie

zdrowotne, innowacyjny charakter badań oraz potencjał poprawy skuteczności leczenia chorób nowotworowych.

Ocena formalna i merytoryczna rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Emilii Balcer to bardzo minimalistyczna wersja przedstawienia własnych osiągnięć naukowych. Pierwszy raz spotykam się z taką formą rozprawy doktorskiej, gdzie jedynym komentarzem jest wprowadzenie, cel i podsumowanie. Uważam, że taka forma nie sprawdza się zwłaszcza w przypadku publikacji wieloautorskich, gdzie Doktorantka powinna wskazać, co stanowi Jej indywidualny wkład. Rozprawę doktorską rozpoczyna strona tytułowa, streszczenie (w języku polskim i angielskim), a zamyka - rozdział *Bibliografia* poprzedzony oświadczeniami współautorów. Pani mgr Emila Balcer nie zamieściła żadnych informacji odnośnie swojego dorobku naukowego. Jak wspomniano powyżej, rozprawa składa się z wprowadzenia (2,5 strony), celu (1,5 strony) podsumowania (1,5 strony) oraz trzech artykułów - pracy przeglądowej i dwóch prac oryginalnych:

1. **Balcer E.**, Sobiech M., Luliński P., *Molecularly imprinted carriers for diagnostics and therapy – A critical appraisal*. *Pharmaceutics*, 2023, 15(6), 1647 - IF: 5,4; Punkty MEiN: 140;
2. **Balcer E.**, Sobiech M., Giebułtowicz J., Sochacka M., Luliński P., *Molecularly imprinted polymers specific towards 4-borono-L-phenylalanine – synthesis optimization, theoretical analysis, morphology investigation, cytotoxicity, and release studies*, *Polymers*, 2023, 15(14), 3149 - IF: 5,0; Punkty MEiN: 100;
3. **Balcer E.**, Giebułtowicz J., Sochacka M., Ruszczyńska A., Muszyńska M., Bulska E., *Investigation of the impact of L-phenylalanine and L-tyrosine pre-treatment on the uptake of 4-borono-L-phenylalanine in cancerous and normal cells using an analytical approach based on SC-ICP-MS*, *Molecules*, 2023, 28(18), 6552 - IF: 4,6; Punkty MEiN: 140.

Doktorantka sprecyzowała nadrzędy cel swoich badań mając na uwadze poprawienie skuteczności terapii borowo-neutronowej (BNCT) z wykorzystaniem borono-fenylalaniny (BPA). Pani mgr Emila Balcer zaproponowała dwa podejścia: wykorzystanie polimerów z nadrukiem molekularnym (MIP) jako nośnika BPA do komórek oraz przedeksponowanie komórek na aminokwasowe analogi BPA typu L w przypadku raka płuc.

Trzy artykuły (wszystkie wydane w 2023 roku w MDPI) są tematycznie powiązane ze sobą. To oryginalne publikacje, które uzyskały już pozytywną opinię w wyniku poddania ich wnikliwej ocenie przez grono ekspertów w danej dziedzinie. Artykuły zostały opublikowane w języku angielskim w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports*. Jak można zauważyć prace są wieloautorskie. Doktorantka we wszystkich publikacjach jest pierwszym autorem, natomiast w żadnej nie jest autorem korespondencyjnym. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (*Impact Factor* – IF) tych prac wynosi 15 zgodnie z rokiem ich opublikowania, co daje średni IF równy 5 dla każdej z prac. Ze względu na wieloautorskie publikacje Pani

mgr Emilia Balcer zamieściła stosowne oświadczenia. Niepokojąca jest rozbieżność informacji zawartych w tych oświadczeniach z tym co jest zawarte w poszczególnych publikacjach jako wkład autorów (*Author Contribution*) i celu pracy. Na przykład w rozdziale 2, gdzie Doktorantka pisze: *opracowałam metodę analityczną na bazie techniki SC-ICP-MS*, w oświadczeniu mamy już współudział. W kontekście oceny rozprawy doktorskiej, rola recenzenta polega na ocenie indywidualnego wkładu Doktorantki w tworzenie pracy zbiorowej, a także na wykazaniu, że Pani mgr Emilia Balcer posiada kompetencje w zakresie formułowania koncepcji badawczych, planowania badań naukowych, przeprowadzania eksperymentów, analizy wyników i wyciągania wniosków. Te kryteria stanowią dowód na to, że Doktorantka jest dojrzałym pracownikiem naukowym i badaczem, co jest jednym z warunków uzyskania stopnia naukowego doktora. W praktyce, recenzent ma za zadanie ocenić, czy praca doktorska spełnia te kryteria. Z załączonych oświadczeń wynika, że w przypadku większości publikacji współautorski udział Doktorantki był większościowy i wynosił w publikacji przeglądowej 60%, zaś w dwóch eksperymentalnych pracach 55%. W tym zakresie wkładu pracy, jak przedkłada Pani mgr Emilia Balcer, mieścił się udział w prowadzeniu badań, między innymi: syntezie polimerów, analizie pojemności adsorpcyjnej, selektywności, badaniu uwolnienia i cytotoksyczności, wykonywaniu analiz laboratoryjnych, interpretacji wyników badań i pisaniu publikacji. Indywidualny udział pozostałych współautorów, w liczbie od 1-6 w zależności od publikacji, był zróżnicowany i wahał się od 5-25%. Jednak bardzo ubogo przygotowany komentarz do ujętych w doktoracie publikacji oraz rozbieżności pomiędzy oświadczeniami a informacjami wkładu poszczególnych autorów w konkretnych artykułach uniemożliwia mi ocenę. Mam nadzieję, że podczas obrony Doktorantka wyjaśni wszystkie nieścisłości tym bardziej, że jest to niezbędny wymóg Ustawy (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595), gdzie w art. 13 jasno jest określone, że: 1. *Rozprawa doktorska, przygotowywana pod opieką promotora, powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego lub artystycznego oraz wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej lub artystycznej, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej lub artystycznej oraz 3. Rozprawę doktorską może także stanowić samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, jeżeli wykazuje ona indywidualny wkład kandydata, odpowiadający warunkom określonym w ust. 1).*

Publikacja 1 (w *Pharmaceutics*, 2023) stanowi interesujący przegląd aktualnych koncepcji i badań związanych z wykorzystaniem polimerów z nadrukiem molekularnym (MIP) w kontekście terapii i diagnostyki nowotworów. Bardzo wnikliwie opisano znaczenie medycyny spersonalizowanej i terapii ukierunkowanej na konkretne cele w walce z chorobami nowotworowymi. Pani mgr Emilia Balcer przedstawiała także zalety i możliwości, jakie niosą ze sobą MIPy w kontekście dostarczania leków (aktywne i pasywne) oraz ich potencjalne zastosowania w terapii nowotworów. Warto zauważyć, że Doktorantka przedstawiała konkretne przypadki zastosowania polimerów w aktywnym

ukierunkowaniu terapii na konkretne białka nowotworowe, takie jak CD59, CD47 czy antygen rakowo-płodowy.

Należy również docenić, że Pani mgr Emilia Balcer zwróciła szczególną uwagę na aspekty diagnostyczne teranostyki, czyli połączenia terapii z diagnostyką. Opisała różne techniki obrazowania, w tym metody fluorescencyjne, rezonans magnetyczny (MR), tomografia komputerowa (CT) oraz tomografia emisji pozytonowej (PET) i pojedynczej emisji fotonowej (SPECT), które można wykorzystać w teranostyce z wykorzystaniem MIPów. Jest to ważne, ponieważ diagnostyka obrazowa odgrywa kluczową rolę w monitorowaniu i ocenie skuteczności terapii nowotworowej. Ponadto, podniesiona została kwestia stabilności polimerów w warunkach biologicznych oraz ich toksyczności, co stanowi istotne wyzwanie w kontekście praktycznego zastosowania tych materiałów w terapii nowotworów. Badania nad biokompatybilnością i toksycznością są niezbędne w celu oceny bezpieczeństwa stosowania tych materiałów u pacjentów.

Podsumowując, omawiany tekst stanowi wartościowy przegląd obecnych badań i możliwości związanych z wykorzystaniem polimerów MIP w terapii i diagnostyce nowotworów. Doktorantka przedstawia różnorodne strategie i techniki, które można zastosować w teranostyce, co może przyczynić się do rozwoju bardziej efektywnych i precyzyjnych metod leczenia nowotworów. Tekst ten stanowi cenny wkład w dziedzinę badań nad nowoczesnymi rozwiązaniami w onkologii i teranostyce.

W **Publikacji 2** (w *Polymers*, 2023) Pani mgr Emilia Balcer przedstawiła wyniki badań dotyczących syntezy polimerów wdrukowanych molekularnie (MIP), które są specyficzne wobec 4-borono-L-fenylalaniny (BPA) i mogą stanowić nośnik związków boru. Doktorantka przeprowadziła pełną charakterystykę fizykochemiczną otrzymanych materiałów i określiła cytotoksyczność wobec linii komórkowych A549 i V79-4. Za bardzo cenne należy uznać elementy modelowania molekularnego w celu określenia oddziaływań BPA we wnęce polimeru. Wyniki tej analizy wykazały współistnienie różnych anionowych form analitu w roztworze zasadowym, które mogą obniżać zdolność wiązania MIP wobec BPA.

Druga, a zarazem ostatnia, część badań (**Publikacja 3** w *Molecules*, 2023) to opracowanie nowatorskiej strategii analitycznej wykorzystującej ICP-MS i ICP-MS pojedynczej komórki (SC-ICP-MS) do oceny skuteczności wychwytu BPA poprzez wstępne podawanie L-tyrozyny i L-fenylalaniny w modelach ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc (A549) i normalnych fibroblastów płuc chomika chińskiego (V79-4). Można stwierdzić, że zaproponowanie takiego podejścia umożliwiło pomiar zawartości boru w liniach komórkowych narażonych na działanie BPA na poziomie poszczególnych komórek i szacowania skuteczności wychwytu czynników borowych. Za niekwestionowane osiągnięcie można uznać opracowaną nową metodę analityczną opartą na SC-ICP-MS do oceny stężenia i dystrybucji boru w komórkach.

Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa doktorska dotyczy interesującego, poznawczego i praktycznego punktu widzenia, problemu leczenia chorób nowotworowych z wykorzystaniem terapii borowo-neutronowej poprzez zastosowanie nowoczesnych systemów dostarczania leków. Analiza i ocena prac eksperymentalnych (**Publikacje 2 i 3**) dowodzi oryginalności rozwiązań problemu naukowego, a także wiedzy Doktorantki w zakresie poruszanej tematyki badawczej. Zaprezentowane wyniki badań otwierają nowy rozdział w badaniach związanych z wykorzystaniem terapii borowo-neutronowej w leczeniu nowotworów.

Uwagi ogólne

Opublikowane artykuły stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej ukazały się w bardzo dobrych czasopismach o światowym zasięgu i uznanym poziomie naukowym. W tym kontekście, ocena poszczególnych publikacji zawartych w rozprawie Doktorantki wydaje się zbędna. Każda z tych publikacji przeszła bowiem rygorystyczny proces weryfikacji, zatwierdzona przez redakcje renomowanych czasopism naukowych oraz poddana niezależnej ocenie przez ekspertów w danej dziedzinie. Dodatkowo badania, na których opierają się te publikacje, były także oceniane przez ekspertów finansujących projekt badawczy. Dlatego moja recenzja może bardziej służyć analizie i dyskusji z autorem pracy, zamiast wskazywaniu na ewentualne błędy. Dlatego też, poniższe uwagi są przyczynkiem do podjęcia dyskusji z Doktorantką, gdzie proszę o wyjaśnienie:

1. poruszanych zagadnień w Publikacji 1:

- tekst opisuje wiele teoretycznych podejść i strategii w obszarze terapii nowotworów, ale nie dostarcza konkretnej informacji na temat postępów w praktycznym zastosowaniu tych technik w medycynie – w tym kontekście moje pytanie brzmi: które z przedstawionych koncepcji jest tylko w sferze teoretycznych rozważań? Jaka jest skuteczność w leczeniu pacjentów z wykorzystaniem poszczególnych podejść?
- w artykule podkreślone jest znaczenie diagnostyki obrazowej w teranostyce, ale dlaczego nie uwzględniono potencjalnych ograniczeń i kosztów związanych z takimi badaniami. Dlatego też nasuwa się pytanie – jakie są konkretne wyzwania związane z przekładalnością wyników badań laboratoryjnych na rzeczywiste korzyści kliniczne?
- podkreślona została potrzeba badań nad toksycznością i stabilnością MIP, co sugeruje, że istnieją poważne obawy co do bezpieczeństwa tych materiałów. Czy nie wpływa to na podważenie potencjału praktycznego zastosowania MIP w terapii nowotworów?

2. w odniesieniu do uzyskanych wyników w Publikacji 2:

- czym kierowała się Doktorantka wybierając do uwalniania BPA roztwór PBS? Efektywność uwalniania była bardzo niska - 4,81% uwalnianego BPA z MIP w ciągu dwóch godzin. Czy jest to wystarczająca dawka boru w podjętej terapii?

- w jaki sposób można zwiększyć terapeutyczną dawkę boru? W jaki sposób wpływa zdolność wiązania zsyntezowanego materiału na efektywność wiązania BPA?
3. w odniesieniu do wyników badań opisanych w **Publikacji 3**:
- jaki wpływ wywiera dieta na wychwyt BPA?
 - czy wykorzystano cytometrię przepływową do wyjaśnienia tworzenia się agregatów komórkowych na etapie przygotowania próbki?

Niewątpliwie, publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej Pani mgr Emilii Balcer opisują kompleksowy zestaw eksperymentów i uzyskanych na ich podstawie wyników, które łączą w sobie wiedzę z zakresu chemii, farmacji, biologii molekularnej, medycyny oraz techniki analitycznej. Ta interdyscyplinarność jest wartością dodaną, która jest obiecująca i może znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej.

Wniosek końcowy

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska Pani mgr Emilii Balcer zatytułowanej *Badania nad wybranymi metodami potencjalnie poprawiającymi skuteczność terapeutyczną 4-borono-L-feniloalaniny w terapii borowo-neutronowej* wnosi elementy nowości, które mają potencjał poszerzenia aktualnego stanu wiedzy w zakresie terapii borowo-neutronowej. Można więc uznać, że rozprawa doktorska spełnia wymogi ujęte 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. z 2017 roku poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). Badania przeprowadzone przez Doktorantkę wskazują na pewne obszary, w których można by poprawić skuteczność terapii, ale ich znaczenie i praktyczna implementacja mogą być nadal kwestią dyskusyjną. Warto podkreślić, że wyniki pracy badawczej mają potencjał do zmiany podejścia do terapii borowo-neutronowej i przyczynią się do dalszego rozwoju tej metody leczenia nowotworów. Dzięki pracy Emilii Balcer, otwiera się nowy rozdział do bardziej skutecznej i precyzyjnej terapii, co może przynieść realne korzyści pacjentom cierpiącym na nowotwory i daje nadzieję na poprawę skuteczności leczenia w przyszłości. W związku z powyższym wnoszę do Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Emilii Balcer do dalszych etapów przewodu postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.