



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Emilii Balcer na temat:

Badania nad wybranymi metodami potencjalnie poprawiającymi skuteczność terapeutyczną 4-borono-L-fenyloalaniny w terapii borowo-neutronowej

Terapia borowo-neutronowa (BNCT) jest jednym z rodzajów radioterapii skutecznej w leczeniu niektórych typów nowotworów, w szczególności nowotworów mózgu. Najpierw do organizmu pacjenta zostaje podany farmaceutyk zawierający nieradioaktywny izotop boru (tzw. nośnik boru), który selektywnie wnika do komórek nowotworowych. Następnie pacjent zostaje poddany naświetlaniu promieniowaniem neutronowym (neutronami epitermicznymi), w wyniku czego dochodzi do reakcji jądrowej prowadzącej do powstania wysokoenergetycznej cząstki α oraz jądra izotopu litu (^7Li). Dzięki temu, że obie cząstki mają bardzo mały zasięg, to podczas tej reakcji niszczone są tylko takie komórki nowotworowe, w których została zakumulowana odpowiednia ilość boru, natomiast sąsiednie, zdrowe komórki pozostają praktycznie nieuszkodzone. Celem prac wielu grup badawczych jest uzyskanie odpowiednich, nietoksycznych nośników boru zdolnych do selektywnego dostarczenia dużej ilości boru, niezbędnej do zajścia reakcji jądrowej, do tkanek nowotworowych, a także poprawa skuteczności dostarczania boru do komórek nowotworowych.

W tym kontekście tematyka i zakres badań prowadzonych przez mgr Emilię Balcer podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej, a więc synteza i charakterystyka nowych materiałów sorpcyjnych opartych na koncepcji odwzorowania molekularnego, specyficznych wobec 4-borono-L-fenyloaminy (BPA), służących do poprawy efektywności dostarczania boru do komórek nowotworowych jest niezwykle aktualna. Co więcej, Doktorantka podjęła również próbę zbadania innej metody poprawy skuteczności przenoszenia związków boru do komórek, a mianowicie przedeksperymentalnego narażania komórek nowotworowych na aminokwasowe analogi BPA typu L, a także wykorzystania nowoczesnej techniki badawczej - spektrometrii mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie pracującą w trybie pomiarowym pojedynczej komórki (SC-ICP-MS) do zbadania rozmieszczenia boru w komórkach.

Praca doktorska wykonana została w Zakładzie Chemii Leków, Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem pani dr hab. Joanny Giebułtowicz (WUM) oraz prof. dr hab. Ewy Bulskiej (UW). Funkcję promotora pomocniczego pełniła dr Monika Sobiech (WUM). Badania Doktorantki prowadzone były w ramach projektu „Radiofarmaceutyki dla ukierunkowanej molekularnie diagnostyki i terapii medycznej, RadFarm” finansowanego z konkursu NCBiR POWER.03.02.00-00-1009/17-00.

Ocena konstrukcji i zakresu badań przedstawionych w rozprawie

Rozprawa doktorska mgr Emilii Balcer ma formę zbioru powiązanych tematycznie artykułów, w skład którego wchodzi 1 praca przeglądowa (P1) i dwie prace oryginalne

(P2, P3) opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie JCR. Praca P1 ukazała się w *Pharmaceutics* (IF 5,4, 140 pkt. MEiN), praca P2 w *Polymers* (IF 5,0, 100 pkt MEiN), zaś praca P3 w *Molecules* (IF 4,6, 140 pkt MEiN). Doktorantka jest pierwszą autorką wszystkich prac, a z dołączonych do rozprawy doktorskiej oświadczeń Doktorantki i współautorów publikacji wynika, że Jej udział w przygotowaniu publikacji był dominujący i wynosił 55-60%. Rozprawa została uzupełniona o wykaz skrótów i symboli, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, opis założeń i celu pracy oraz krótkie podsumowanie. Bibliografia zawiera 29 pozycji, ale trzeba pamiętać, że praca przeglądowa została przygotowana w oparciu o 100 pozycji literaturowych, zaś pozostałe publikacje zawierają odpowiednio 37 i 44 odnośniki.

Wszystkie artykuły zamieszczone w rozprawie doktorskiej zostały wcześniej poddane ocenie recenzentów i edytorów naukowych, co niewątpliwie ułatwia pracę recenzentowi rozprawy, jednak nie zwalnia go z obowiązku dokonania własnej analizy i oceny. Co więcej, w przypadku rozpraw doktorskich przygotowanych w oparciu o wieloautorskie publikacje niezbędna jest ocena indywidualnego/autorskiego wkładu Doktoranta w powstanie tych prac.

Praca „*Molecularly imprinted carriers for diagnostics and therapy - a critical appraisal*” (P1) zawiera przegląd literatury na temat wykorzystania materiałów polimerowych wytworzonych w oparciu o koncepcję odwzorowania molekularnego w terapii i diagnostyce medycznej, w szczególności jako nośników leków w terapii nowotworów oraz jako ligandów rozpoznających określone domeny na powierzchni komórki (na przykład glikoproteiny ulegające nadekspresji w procesie nowotworowym). Wyróżnione zostały różne podejścia do ukierunkowanej molekularnie diagnostyki i terapii z wykorzystaniem MIP: *aktywne* - polegające na wykorzystaniu wspomnianego wcześniej rozpoznania molekularnego, *pasywne* - oparte na wzmocnionym efekcie przepuszczalności i retencji, co pozwala małym cząsteczkom gromadzić się w miejscach guza oraz teranostyczne - pozwalające jednocześnie na wykrywanie procesów chorobowych w ciele pacjenta i podjęcie działań, które umożliwiają dostarczenie leków bezpośrednio do obszarów objętych procesem chorobowym. Zidentyfikowane zostały również wyzwania związane ze stosowaniem MIP w teranostyce, a mianowicie efektywność i powtarzalność procesu odwzorowania cząsteczek w MIP, bezpieczeństwo stosowania oraz koszty wytwarzania takich materiałów, a także spełnienie regulacji prawnych w celu ich wprowadzenia do praktyki klinicznej. To bardzo ciekawa praca pokazująca stan zaawansowania badań nad wykorzystaniem MIP w medycynie. W mojej ocenie praca stanowi bardzo dobre wprowadzenie do eksperymentalnej części pracy doktorskiej. Udział Doktorantki w przygotowaniu tej pracy polegał na przeglądzie literatury oraz uczestnictwie w przygotowaniu manuskryptu.

W publikacji zatytułowanej „*Molecularly imprinted polymers specific towards 4-borono-L-phenylalanine—synthesis optimization, theoretical analysis, morphology investigation, cytotoxicity, and release studies*” (P2) opracowana została metoda syntezy polimerów MIP zdolnych do dostarczania boru (w postaci BPA) do komórek nowotworowych przed terapią BNCT. W celu wybrania ligandu o największym powinowactwie do cząsteczki matrycy przeprowadzono analizę teoretyczną energii tworzenia kompleksów L-fenylalaniny (analogu BPA) z wybranymi monomerami

funkcyjnymi (wykorzystując teorię funkcjonału gęstości, DFT, będącą filarem modelowania molekularnego). Na tej podstawie jako monomer funkcyjny wybrano kwas metakrylowy. Następnie wykonano symulację i analizę interakcji pomiędzy analitem a polimerami z odwzorowaną cząsteczką matrycy występujących w różnych warunkach eksperymentalnych (pH roztworu). W tym przypadku rozważano również wpływ różnych monomerów sieciujących na wiązanie analitu. Rozważania te pozwoliły na wyselekcjonowanie polimeru o potencjalnie największej specyficzności w stosunku do BPA i ograniczenie zakresu prac eksperymentalnych.

W oparciu o wyniki powyższych badań Doktorantka zsyntezowała w reakcji polimeryzacji wolnorodnikowej polimery blokowe oraz polimery o uporządkowanej strukturze plastra miodu, a następnie przeprowadziła ich charakterystykę. Wyzaczyła pojemności sorpcyjne dla trzech stężeń analitu, współczynniki podziału analitu oraz „imprinting factor”, który określa selektywność polimeru z odwzorowanymi cząsteczkami (MIP) w stosunku do polimeru kontrolnego (NIP). Badania morfologii powierzchni otrzymanych polimerów wykonała techniką SEM, zaś badania ich struktury techniką FT-IR. Wykazała, że zdolność wiązania analitu przez MIP w bardzo dużym stopniu zależy od monomeru sieciującego, który odpowiada za morfologię matrycy polimerowej oraz właściwości mechaniczne i porowatość polimeru. Wykazała również, że polimery o strukturze plastra miodu charakteryzują się wyższą pojemnością sorpcyjną niż polimery blokowe, co wyjaśniła lepszą dostępnością analitu do miejsc sorpcyjnych, ale posiadają mniejszą selektywność ze względu na występowanie znaczącej adsorpcji niespecyficznej. Szkoda, że nie przeprowadziła badań powierzchni właściwej, objętości i rozkładu wielkości porów polimerów metodą niskotemperaturowej adsorpcji/desorpcji azotu, co z pewnością pozwoliłoby zweryfikować powyższe wnioski. Badania uwalniania analitu zatrzymanego na MIP o strukturze plastra miodu do wodnego roztworu metanolu oraz PBS wykonała po 20, 60 i 120 minutach kontaktu. Do tej części pracy mam kilka uwag i pytań. Nie znalazłam w rozprawie powtarzalności procesu uwalniania analitu z MIP-ów (choć badania powtarzano trzykrotnie) ani niepewności oznaczania BPA metodą LC-MS, trudno więc ocenić na ile istotne są zmiany uwalniania BPA w czasie, szczególnie w PBS. Czy uzasadnione jest podawanie wartości desorpcji BPA z MIP jako np. 4,81%? Proszę o przedstawienie interpretacji rysunków 6 i 7. Jakie było sumaryczne uwolnienie analitu z MIP? Dlaczego nie zbadano uwalniania BPA z MIP w fizjologicznym zakresie pH?

Na koniec Doktorantka przeprowadziła badania cytotoksyczności (test MTT) wybranych polimerów (a raczej ich ekstraktów) w stosunku do niedrobnokomórkowego raka płuc oraz prawidłowych fibroblastów płuc. Wykazała, że polimery charakteryzują się niską toksycznością w stosunku do obu rodzajów komórek, co pozwala traktować je jako bezpieczne dla ludzi.

Wkład Doktorantki do tej pracy polegał na przeprowadzeniu syntezy i charakterystyki polimerów, a także badań ich cytotoksyczności, udziale w interpretacji wyników, analizie danych oraz w przygotowaniu manuskryptu.

Cel badań i całościową koncepcję ich realizacji przedstawioną w tej części rozprawy, włącznie z badaniem toksyczności materiałów, oceniam wysoko. Doktorantka przeprowadziła wstępne badania nad układami dostarczania boru w postaci 4-borono-L-fenyloaminy do komórek na bazie MIP jako nośnika. Pomimo pewnych niedociągnięć analitycznych, o których wspomniałam wcześniej, to atrakcyjne podejście do

teranostyki. Ciekawa jednak jestem opinii Doktorantki na temat potencjalnych zagrożeń jakie niesie za sobą stosowanie syntetycznych MIP-ów jako nośników leków i dalszych ich losów w organizmie. Co Doktorantka sądzi na temat użyteczności i bezpieczeństwa stosowania innych, wprowadzanych powoli do praktyki, nośników leków, takich jak naturalne polimery (polisacharydy czy polipeptydy) czy nanocząstki lipidowe.

Na koniec jeszcze uwaga językowa do wstępu do rozprawy. Stosowana przez Doktorantkę nazwa „polimery wdrukowane molekularnie” to kalka językowa terminu „molecularly imprinted polymers”. Sądzę, że rodzime słownictwo najlepiej oddające ideę takich materiałów to „polimery z odwzorowanymi cząsteczkami” lub „polimery dopasowane cząsteczkowo”.

W publikacji *„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” (P3)* Doktorantka przeprowadziła badania ekspozycji komórek na badane związki, przygotowała próbki komórkowe do oznaczania boru oraz brała udział w badaniach wykonanych za pomocą technik spektralnych. Uczestniczyła również w opracowaniu wyników i przygotowaniu manuskryptu.

Celem tej pracy była ocena skuteczności przedekspozycyjnego narażania komórek nowotworowych i zdrowych na aminokwasowe analogi BPA typu L, a mianowicie L-fenylalaninę i L-tyrozinę, na przenoszenie związków boru do komórek. Stężenie boru w komórkach oznaczono metodą ICP-MS. Badania wykonano na takich samych liniach komórkowych jak w poprzedniej pracy. Eksperyment zaplanowano i wykonano poprawnie, przeprowadzono również statystyczną analizę wyników pomiarów. Badania wykazały wzrost wychwytu nośnika boru przez komórki nowotworowe narażone na L-tyrozinę, natomiast w przypadku komórek zdrowych efekt ten występował w przypadku ekspozycji na oba związki. Potencjalnie działanie takie może wspomóc proces wzbogacania komórek nowotworowych w bor, chociaż w praktyce wydaje mi się to trudne do osiągnięcia.

Nowością naukową pracy jest zbadanie dystrybucji boru w komórkach nowotworowych poddanych działaniu L-tyrozyny za pomocą techniki ICP-MS pracującej w trybie pomiarowym pojedynczej komórki (SC). To bardzo nowoczesne podejście do badań, pozwalające na uzyskanie unikalnych informacji, takich jak heterogeniczność rozmieszczenia leku w komórkach tkanek nowotworowych. Badania te należy jednak moim zdaniem traktować jako pilotażowe, gdyż brakuje chociażby oszacowania precyzji pomiarów stężenia analitu techniką SC-ICP-MS, czy precyzji pomiarów liczności komórek, co sprawia, że prezentowane wyniki mają raczej charakter jakościowy. W tym przypadku trudno jest interpretować różnice pomiędzy wartościami 39,45% i 40,97% podanymi w Tabeli 1 dla komórek narażonych na BPA oraz eksponowanych na L-tyrozinę. A przecież jest to materiał biologiczny, charakteryzujący się dużą niejednorodnością. W pracy zaprezentowano jednak potencjał metody SC-ICP-MS do oceny efektywności dostarczania leków zawierających heteroatomy do komórek. Drobną uwagą do publikacji: w tabeli 2 zabrakło jednostki przy wartości granicy odcięcia.

Cel badań i koncepcję tej pracy również oceniam bardzo wysoko. Praca jest poprawna metodologicznie, badania zaplanowano logicznie i starannie wykonano, chociaż mam pewne uwagi, o których wspomniałam wcześniej, do sposobu opracowania wyników.

Uzyskano bardzo ciekawe informacje jakościowe odnośnie pobierania i akumulowania boru w komórkach oraz oceniono wpływ ekspozycji komórek zdrowych i nowotworowych na wybrane analogi BPA na pobieranie badanego związku boru.

Podsumowanie

Zakres badań przedstawiony w rozprawie doktorskiej jest uzasadniony poszukiwaniami sposobów poprawy skuteczności terapii borowo-neutronowej w leczeniu nowotworów. Konstrukcja rozprawy jest właściwa, chociaż mam pewien niedosyt związany z bardzo okrojoną wersją wstępu oraz podsumowania i wniosków. Lektura pracy przeglądowej pozwala mi jednak stwierdzić, że Doktorantka posiada wiedzę teoretyczną w swojej dyscyplinie naukowej. Publikacje będące dorobkiem naukowym Pani Emilii Balcer, zawarte w nich wyniki doświadczalne, sposób interpretacji i wnioskowania wskazują, że Doktorantka posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych, a także pracy w zespole badawczym. Założone przez Doktorantkę cele rozprawy zostały zrealizowane. Rozprawa naukowa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i w pełni spełnia kryteria ustawowe stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne określone w art. 13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. z późn. zmianami*.

Wnoszę zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie pani mgr Emilii Balcer do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Białystok 07.11.2023 r.