Szczecin, 19.06.2018

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Piktel pt. "Aktywność przeciwnowotworowa nanocząsteczek magnetycznych sfunkcjonalizowanych analogami kationowych peptydów przeciwbakteryjnych" wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Roberta Buckiego z Samodzielnej Pracowni Technik Mikrobiologicznych i Nanobiomedycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Terapia nowotworów, pomimo zaangażowania ogromnych środków finansowych oraz nakładu pracy, do dnia dzisiejszego nie jest zadowalająca. Stały postęp wiedzy dotyczący patofizjologii komórki nowotworowej oraz czynników warunkujących farmakokinetykę i farmakodynamikę leków przeciwnowotworowych, umożliwiły wprowadzenie do klinicznego zastosowania nowych, celowanych drobnocząsteczkowych leków przeciwnowotworowych, leków biologicznych (przeciwciała, białka fuzyjne) oraz terapii genowej (komórki CAR-T). Nowe strategie terapeutyczne przyczyniły się jednakże do poprawy skuteczności leczenia w odniesieniu do niektórych typów nowotworów, zwłaszcza o określonej charakterystyce molekularnej. Jedną z przyczyn ograniczonej skuteczności farmakoterapii przeciwnowotworowej jest ograniczona wybiórczość dystrybucji leków/substancji biologicznie aktywnych do komórek nowotworowych oraz aktywacja mechanizmów usuwających leki w komórkach nowotworowych. Dlatego nadal poszukuje się skutecznych onkologicznych strategii terapeutycznych opartych nie tylko na poszukiwaniu nowych cząsteczek o aktywności przeciwnowotworowej, ale również umożliwiających ich efektywną penetrację i retencję w komórkach nowotworowych. Dlatego też temat badawczy podjęty przez Doktorantkę jest w pełni aktualny, łączący zastosowanie nośników leków o potencjalnej zdolności bardziej wybiórczego transportu do komórki nowotworowej, umożliwiających jednocześnie ominięcie funkcjonalnej bariery błonowej uwarunkowanych występowaniem transporterów „wyrzucających" (ang. *efflux transporters*) z nowymi cząsteczkami o aktywności przeciwnowotworowej. tj. peptydem LL-37 i cerageniną CSA-13. Należy również podkreślić, że założenia rozprawy doktorskiej znalazły uznanie ekspertów Narodowego Centrum Nauki - badania stanowiące podstawę przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej były finansowane z funduszy Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu PRELUDIUM pt. „Immunomodulujące właściwości nanosystemów zawierających substancje aktywne błonowo oraz ich potencjał w terapii nowotworów lekoopornych". Ponadto Doktorantka uzyskała środki finansowe na przygotowanie rozprawy doktorskiej w ramach programu stypendialnego Naukowej Fundacji Polpharmy (VI edycja).

Na rozprawę doktorską mgr Eweliny Piktel składają się trzy prace opublikowane w renomowanych czasopismach: dwie prace poglądowe - 1) Piktel E, Niemirowicz K, Wątek M, Wollny T, Deptuła P, Bucki R. Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy. J. Nanobiotechnology. 2016, 14:39 (IF=4.946) oraz Piktel E, Niemirowicz K, Wnorowska U, Wątek M, Wollny T, Głuszek K, Góźdź S, Levental I, Bucki R. The Role of Cathelicidin LL-37 in Cancer Development. Arch. Immunol. Ther. Exp (Warsz). 2016, 64:33-46 (IF=2.040) oraz jedna praca oryginalna – 1) Piktel E, Prokop I, Wnorowska U, Król G, Cieśluk M, Niemirowicz K, Savage PB, Bucki R. Ceragenin CSA-13 as free molecules and attached to magnetic nanoparticle surfaces induce caspase-dependent apoptosis in human breast cancer cells via disruption of cell oxidative balance. Oncotarget. 2018, 9:21904-21920 (IF=5.168). We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, jej udział w powstaniu poszczególnych prac wynosi odpowiednio: 55%, 70% oraz 62%, co zostało potwierdzone przez pozostałych współautorów poszczególnych prac. Ponadto przedłożona do oceny praca zawiera wstęp, omówienie prac składających się na pracę doktorską, zdefiniowane cele pracy, omówienie materiałów i metod, wyników oraz wniosków jak również streszczenia w języku polskim i angielskim.

We wstępie Doktorantka przedstawiła mechanizmy leżące u podłoża oporności komórek nowotworowych (może należałoby również uwzględnić informacje o zmniejszonej ekspresji transporterów wychwytujących, również niektóre leki przeciwnowotworowe, np. OCT1 oraz OCT3), potencjalne zastosowanie naturalnych peptydów przeciwbakteryjnych i ich analogów w terapii nowotworów (omówione szczegółowo w opublikowanej pracy poglądowej) oraz zastosowania nanostruktur jako nośników terapii przeciwnowotworowych (omówione szczegółowo w opublikowanej pracy poglądowej).

W oparciu o przesłanki zawarte we wstępie i pracach poglądowych Doktorantka sformułowała następujące cele pracy doktorskiej: 1) ocena aktywności przeciwnowotworowej peptydu LL-37, jego syntetycznego analogu CSA-37 oraz opartych na nich nanosystemów w stosunku do linii komórek raka piersi MCF-7 oraz MDA-MB-231; 2) supresja zdolności ludzkiej katalicydyny do stymulacji wzrostu komórek nowotworowych poprzez jej immobilizację na powierzchni nanocząsteczek magnetycznych o udowodnionym działaniu przeciwnowotworowym; 3) ocena mechanizmu przeciwnowotworowego działania cerageniny CSA-13 oraz MNP@CSA-13 w stosunku do komórek raka piersi MCF-7 oraz 4) określenie wpływu immobilizacji cerageniny CSA-13 na powierzchni nanocząsteczek magnetycznych na jej aktywność przeciwnowotworową.

Dla zrealizowania postawionych celów Doktorantka przeprowadziła badania na liniach komórkowych raka piersi, wykazujących ekspresję oraz pozbawionych receptora estrogenowego, tj. MCF7 (ATCC®HTB-22™) oraz MDA-MB-231 (ATCC®HTB-26™). Przy zastosowaniu technik kolorymetrycznych (MTT, LDH) oraz

cytofluorymetrycznych wykonała analizę cytotoksyczności badanych związków w postaci wolnej oraz w postaci nanosystemów, wraz z określeniem jej mechanizmów (m. in. procesu apoptozy, aktywacji kaspaz, powstawania reaktywnych form tlenu, zmian zawartości glutationu) oraz przy zastosowaniu mikroskopii konfokalnej określiła wewnątrzkomórkową internalizację badanych nanosystemów. Należy stwierdzić, że sposób zaplanowania badań oraz ich realizacja świadczą o bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktorantki. Wynikają one również z długotrwałej pracy i doświadczenia w obszarze prowadzonego badania promotora prof. Roberta Buckiego, który jest uznanym ekspertem w dziedzinie. Być może uzasadnione byłoby przeprowadzenie badań na komórkach nienowotworowych, co umożliwiłoby zdefiniowanie stopnia internalizacji badanych związków i nanostruktur przez komórki nienowotworowe oraz ich aktywności biologicznej. Ponieważ badane nanostruktury charakteryzują się właściwościami magnetycznymi uzasadnione byłoby również ustalenie wpływu pola magnetycznego na internalizację i aktywność biologiczną peptydu LL-37 i cerageniny CSA-13 i badanych nanostruktur. Do określenia wewnątrzkomórkowej lokalizacji CSA-13 oraz MNP@CSA-13 można by zastosować projekcję 3D, która wskazuje bezpośrednio na wewnątrzkomórkową internalizację.

Po przeprowadzeniu szeregu dobrze zaprojektowanych doświadczeń Doktorantka wykazała m.in., aktywność przeciwnowotworową cerageniny CSA-13 oraz MNP@CSA-13 potwierdzoną w testach MTT oraz LDH; wykazanie wpływu cerageniny CSA-13 oraz MNP@CSA-13 na zaburzenie równowagi oksydoredukcyjnej (wzbudzenie stresu oksydacyjnego): zmniejszenie aktywności czynników przeciwutleniających; aktywację procesu apoptozy (test z aneksyn V, wzrost aktywacji kaspaz, fragmentację DNA). Wykazano również, że immobilizacja cerageniny na powierzchni nanocząstek magnetycznych na bazie tlenku żelaza istotnie nasila aktywność przeciwnowotworową (głównie przez wzrost wewnątrzkomórkowej internalizacji i nasilenia stresu oksydo-redukcyjnego). Wyniki części doświadczalnej pracy doktorskiej opublikowano w renomowanym czasopiśmie Oncotarget (2018, 9:21904-21920). Cennym więc byłoby uzupełnienie uzyskanych wyników o dane dotyczące wpływu pola magnetycznego na internalizację CSA-13 oraz MNP@CSA-13 (oraz w przyszłości określenie wpływu pola magnetycznego na bardziej swoistą dystrybucję badanych nanocząstek w obrębie guza nowotworowego i aktywność przeciwnowotworową).

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka przedstawiła pięć wniosków: 1. Istotne statystyczne zmniejszenie przeżywalności komórek rakowych MCF7 (ATCC®HTB-22™) oraz MDA-MB-231 (ATCC®HTB-26™) w obecności cerageniny CSA-13 oraz nanosystemu zawierającego cząsteczki CSA-13 zimmobilizowane na powierzchni nanocząsteczek magnetycznych tj. MNP@CSA-13 sugeruje ich znaczny potencjał przeciwnowotworowy; 2. Immobilizacja peptydu LL-37 na powierzchni nanocząsteczek magnetycznych na

bazie tlenku żelaza nieznacznie zmniejsza zdolność wolnego peptydu do stymulacji wzrostu komórek nowotworowych; 3. Inkubacja komórek raka piersi MCF-7 w obecności CSA-13 oraz MNP@CSA-13 skutkuje indukcją apoptozy, co uwarunkowane jest zaburzeniem równowagi oksydo-redukcyjnej, zwiększeniem przepuszczalności błon mitochondriów, depolaryzacją błony mitochondrialnej oraz aktywacją kaspaz; 4. Immobolizacja cerageniny CSA-13 na powierzchni nanocząstek magnetycznych na bazie tlenku żelaza i tym samym wykorzystanie MNP jako nośników leków istotnie nasila aktywność przeciwnowotworową analizowanego analogu, głównie poprzez wzrost wewnątrzkomórkowej internalizacji i zwiększenie stężenia związku we wnętrzu komórki, a także poprzez nasilenie zmian w statusie oksydo-redukcyjnym komórki rakowej, co sugeruje możliwość zastosowania magnetycznych nanosystemów w terapii nowotworów lekoopornych; 5. Uzyskane wyniki badań wskazują na możliwość wykorzystania syntetycznych analogów naturalnych peptydów przeciwbakteryjnych z grupy ceragenin w skutecznej eradykacji komórek rakowych, sugerują możliwość powstania nowych form terapii przeciwnowotworowej w oparciu o związki o aktywności błonowej oraz zawierające je nanosystemy, a także uzasadniają prowadzenie dalszych badań w tym obszarze. Sformułowane przez Doktorantkę wnioski dobrze oddają uzyskane wyniki, wynikają bezpośrednio z analizy wyników uzyskanych w czasie realizacji badań. Niektóre z nich powinny być bardziej uogólnione (wniosek 1), część wniosku 4 i 5 zawiera podobne treści.

Reasumując należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Autorki, która dobrze opanowała niełatwy warsztat badawczy i wykazała dobre merytoryczne przygotowanie. Uważam, że praca stanowi znaczący dorobek z elementami nowości naukowych i w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim. Dlatego też zwracam się do Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim w Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Eweliny Piktel do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na bardzo wysoki poziom merytoryczny pracy, docenionej również przez grono międzynarodowych ekspertów, wnioskuję o wyróżnienie pracy *summa cum laude*. Wyniki pracy opublikowano w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (Warsz) (IF=2,040), *Journal of Nanobiotechnology* (IF=4,946) oraz *Oncotarget* (IF=5,168).

Prof. dr hab. n. med. Marek Droździk