



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 2019-06-18

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk
Zakład Onkologii Doświadczalnej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
Wrocław

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Pamelii Krug pt. „Otrzymywanie, charakterystyka fizykochemiczna i ocena aktywności przeciwnowotworowej nanocząstek selenu i telluru modyfikowanych sulforafanem” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Macieja Mazura, prof. UW oraz dr hab. Katarzyny Wiktorskiej, prof. NIL

Zwalczanie chorób nowotworowych, zwłaszcza w przypadku obecności przerzutów wciąż pozostaje dużym problemem klinicznym, pomimo znacznego postępu, jaki dokonuje się w tej dziedzinie w ostatnich latach. Jednym z największych wyzwań pozostaje toksyczność stosowanych terapii, która ze względu na brak jednoznacznie unikalnych dla tkanki nowotworowej cech, w porównaniu do tkanek prawidłowych (różnice ilościowe raczej niż jakościowe) jest jedną z przyczyn niepowodzenia terapii przeciwnowotworowych. Stąd cel, jaki postawiła sobie doktorantka przystępując do realizacji pracy doktorskiej jest w pełni uzasadniony.

Przechodząc do formalnej oceny układu pracy: nie jest on tradycyjny, gdyż nie wyodrębniono rozdziału dyskusja, który w mojej opinii w pracach doktorskich jest bardzo istotny i umożliwia ocenę zdolności doktoranta do krytycznej analizy uzyskanych wyników. Jednakże elementy dyskusji przewijają się zarówno w podrozdziałach opisujących wyniki, jak i w rozdziale podsumowanie. Brakuje także wniosków, jako wyodrębnionej części pracy. Wnioski można wyszukać w poszczególnych rozdziałach pracy, jednakże zebrane w jednym miejscu byłyby dobrym podsumowaniem znaczenia naukowego uzyskanych wyników. Pozostałe elementy rozprawy doktorskiej, takie jak wstęp merytoryczny, cel pracy, opis metod czy wykaz piśmiennictwa znalazły swoje odzwierciedlenie w pracy doktorskiej mgr Pamelii Krug.

Praca mgr Pamelii Krug ma charakter interdyscyplinarny. Pierwsza część pracy została poświęcona otrzymaniu i charakterystyce nanocząstek selenu i telluru, zaś część druga ocenie ich aktywności biologicznej. Wobec tego wstęp merytoryczny wprowadza zarówno w zagadnienia związane z właściwościami nanomateriałów, jak i zagadnienia związane z wykorzystaniem nanomateriałów oraz samego selenu, telluru i sulforafanu w terapiach przeciwnowotworowych. Następnie Autorka opisała materiały użyte w badaniach oraz wykorzystane w nich metody. Zastosowano dużą liczbę metod, zarówno dotyczących



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

charakterystyki samych nanocząstek, jak i badań biologicznych, stąd może wynikać czasem bardzo pobieżny ich opis, a część wiadomości o sposobie przeprowadzenia doświadczeń znajduje się dopiero w rozdziale opisującym wyniki. W związku z tym chciałabym zadać Doktorantce następujące pytania; te odnoszące się do części nie-biologicznej proszę potraktować jako pytania laika w dziedzinie otrzymywania i badania właściwości fizykochemicznych nanocząstek:

1. W opisie metodyki otrzymywania nanocząstek selenu opisano jedną procedurę w której zastosowano określone proporcje ilościowe składników mieszaniny – czy te proporcje składowych oraz czas ich „mieszania”, tj. 0,5h wyznaczono eksperymentalnie, czy też w inny sposób – jaki?
2. Dlaczego nie zastosowano jednolitej procedury otrzymywania nanocząstek wykorzystywanych we wszystkich badaniach oraz na ile woda vs sól fizjologiczna użyte w procedurach otrzymywania nanocząstek mogły wpłynąć np. na rozmiar czy inne właściwości nanocząstek?
3. W jaki sposób oceniano skuteczność pozbycia się np. wolnego sulforafanu czy kwasu askorbinowego czy też selenu z próbek używanych w badaniach biologicznych? Na mapach EDS widoczne są zielone kropki poza obszarem, gdzie uwidoczniony jest selen – czy to znaczy, że wolny sulforafan znajdował się w roztworze nanocząstek? Jeśli tak to w jakim stężeniu. To samo dotyczy kwasu askorbinowego, którego właściwości, również dotyczące potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej są znane.
4. Wracając do kwasu askorbinowego: czy na powierzchni nanocząstek selenu opłaszczonych sulforafanem i nieopłaszczonych mogły znajdować się podobne ilości kwasu askorbinowego?
5. W przypadku nanocząstek telluru, które zmieniały się w czasie – dlaczego zatrzymano się na czasie 16h, czy po dłuższym czasie nie mogło dojść do dalszych modyfikacji nanocząstek? Czy nanocząstki selenu nie zmieniałyby się w czasie, tak jak miało to miejsce w przypadku nanocząstek telluru?
6. W nawiązaniu do pytania 1 i 5: czy oceniono stabilność w roztworach np. medium hodowlanym czy osoczu otrzymanych nanocząstek?
7. Badania na zwierzętach: w metodyce nie opisano procedury podania dożylnego nanocząstek, nie wiadomo także w jaki sposób pobrano krew tętniczą oraz, czy w przypadku, gdy jest mowa po prostu o krwi, czy jest to krew żylna czy może mieszana tętniczo-żylna?
8. Od szczurów w różnych odstępach czasu pobierano kał – nie przedstawiono wyników tych badań.
9. Jaki był udział doktorantki w badaniach, w których wskazano, że ich wykonawcami były inne osoby?



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Opis wyników, uzupełniony o niektóre szczegóły metodyki oraz zawierający elementy dyskusji jest bogato ilustrowany zdjęciami, wykresami i tabelami. Na podstawie zaprezentowanych wyników, Doktorantka dowodzi, że uzyskane nanocząstki, które scharakteryzowała pod względem wielkości i składu, ze względu na swój charakter mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu przeciwnowotworowym. Ze względu na specyficzność uzyskanych nanocząstek telluru oraz niemożność uzyskania takich nanocząstek bez obecności sulforafanu, Doktorantka zdecydowała się na głębszą analizę biologiczną nanocząstek selenu. Nie świadczy to oczywiście o mniejszej wartości naukowej Jej pracy związanej z uzyskaniem i charakterystyką nanocząstek telluru, które z pewnością, same w sobie są interesujące, a teoretycznie można podjąć próby ich zastosowania, jak sugeruje Doktorantka, stosując doguzową drogę iniekcji. Podczas analizy danych dotyczących sposobów modyfikacji powierzchni nanocząstek, przytaczanych we wstępie, a później także w pozostałych częściach pracy, w tym w opisie wyników, nasunęło mi się pytanie związane z omawianym przez doktorantkę zagadnieniem podejścia „fizycznego” lub „chemicznego” do modyfikacji powierzchni nanocząstek. Dlaczego w swoich badaniach Doktorantka zastosowała adsorbcję fizyczną (jak podaje we wstępie), a nie metody chemiczne? Czy w przypadku badanych nanocząstek i celu ich ewentualnego zastosowania któraś z tych metod jest korzystniejsza? W rozdziale opisującym wyniki Doktorantka stwierdza, że SFN najprawdopodobniej oddziałuje z powierzchnią nanocząstek poprzez grupę sulfotlenkową. Czy należy rozumieć, że jest to oddziaływanie fizyczne? Można je jakoś zdefiniować? Przeprowadzając zaś analizę składu nanocząstek Doktorantka stwierdza, że obecność jednego z pasm (3433cm^{-1}) może wynikać z zanieczyszczeń odczynnika – który z odczynników był zanieczyszczony i czym mogą być te zanieczyszczenia? Czy przebadano pod tym kątem poszczególne odczynniki przed przystąpieniem do badań? W jaki sposób użycie zanieczyszczonych odczynników mogło wpłynąć na wyniki badań biologicznych?

Badając właściwości biologiczne nanocząstek selenu opłaszczonych sulforafanem, Doktorantka stwierdza (na podstawie porównania z danymi z piśmiennictwa), że są one mniej toksyczne w porównaniu do seleninu sodu, który posłużył do ich wytworzenia. W krótkoterminowym (24h obserwacji) doświadczeniu przeprowadzonym na szczurach stwierdzono brak wystąpienia niekorzystnych objawów ze strony organizmu tych zwierząt. Oczywiście tak zaplanowane doświadczenie nie jest w stanie wykazać czy ogólnie nanocząstki w tej jednej dawce nie są toksyczne, z czego Doktorantka zdaje sobie sprawę i podkreśla konieczność dalszych badań, ale daje jakąś wskazówkę, zwłaszcza, gdy porównamy to z danymi przytoczonymi w publikacji, cytowanej jako 290, gdzie stan zwierząt oceniano po 48h, a niektóre dawki seleninu sodu już wywoływały śmierć zwierząt. Dodatkowo, na podstawie wyników badań przeprowadzonych na szczurach (morfologia i niektóre parametry biochemiczne) autorka wnioskuje o braku aktywowania odpowiedzi immunologicznej organizmu. Jednakże trudno ocenić, który z paramentów mógłby na to wskazywać, ponadto tak



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

krótki czas obserwacji raczej uniemożliwia takie wnioskowanie. Ponadto nasuwa się dodatkowo pytanie, dlaczego w tych badaniach nie porównano nanocząstek selenu opłaszczonych do nieopłaszczonych sulforafanem? Taki sposób wykonania badań umożliwić mogłoby stwierdzenie przewagi jednych nanocząstek nad drugimi w zakresie ewentualnych efektów ubocznych.

Mgr Pamela Krug przeprowadziła także szeroki zakres badań *in vitro*. W pierwszym etapie oceniła aktywność cytotoksyczną nanocząstek selenu i telluru wobec komórek nowotworowych i prawidłowych (raka gruczołu piersiowego i okrężnicy). Takie badania porównawcze, z zastosowaniem komórek nowotworowych i ich odpowiedników prawidłowych są bardzo cenne, gdyż dają wstępne wskazówki dotyczące potencjalnej toksyczności badanych substancji. Na podstawie obliczeń dokonanych metodą Chou-Talalay, autorka pokazuje istnienie synergizmu sulforafanu i nanocząstek selenowych wobec linii komórek nowotworowych i, w niektórych zakresach dawek, antagonizmu wobec komórek prawidłowych. Wyniki tych badań wskazują na pewną selektywność działania nanocząstek wobec komórek nowotworowych. W badaniach tych brakuje bezpośredniego porównania aktywności cytotoksycznej nanocząstek selenu opłaszczonych i nieopłaszczonych sulforafanem, w formie np. IC50. Pokazano tylko wyniki obliczeń (współczynnik CI) powstałe na bazie konkretnych wyników oceniających proliferację komórek, zaś brakuje tych „twardych danych” eksperymentalnych, które bezpośrednio pokazywałyby przewagę tego „opłaszczenia”.

Autorka sugeruje, na podstawie danych literaturowych, że ewentualną przyczyną wyższej aktywności nanocząstek selenu opłaszczonych sulforafanem nad nieopłaszczonymi są specyficzne interakcje sulforafanu z receptorami, których miałyby być więcej na komórkach nowotworowych w porównaniu do prawidłowych. Co to za receptory i czy rzeczywiście badane komórki różnią się pod względem ich obecności na powierzchni? Jeśli różnice w tej selektywności miałyby rzeczywiście podłoże związane z biodostępnością – lepszą dla komórek nowotworowych niż prawidłowych, to w zasadzie wszystkie obserwowane różnice uzyskane w badaniach dotyczących mechanizmu działania wynikają z tego, że mniej nanocząstek dostaje się do wnętrza komórki, a więc i ich skutki działania są mniejsze. Oczywiście aby to stwierdzić należałoby sprawdzić zawartość nanocząstek w komórce, czy choćby porównać ekspresję wspomnianych receptorów. Ponadto, aby porównać procesy zachodzące w tych dwóch rodzajach komórek, nowotworowych i prawidłowych, interesujące byłoby użycie nie tych samych stężeń nanocząstek, ale stężeń wywołujących ten sam efekt biologiczny np. IC20.

Na podstawie badań wykonanych przy użyciu mikroskopii konfokalnej i cytometrii przepływowej, autorka oceniła przebieg cyklu komórkowego oraz zbadała niektóre cechy śmierci komórek (ekspresja fosfatydyloseryny, aktywacja kaspaz, potencjał mitochondrialny), w tym te wskazujące, że prawdopodobnym rodzajem śmierci komórek indukowanym przez nanocząstki selenu jest apoptoza. Autorka oceniła również poziom reaktywnych form tlenu w badanych komórkach. Analizy te wykonała na 2 liniach wywodzących się z gruczołu



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

piersiowego: prawidłowej i nowotworowej. W opisie wyników aktywności biologicznej brakuje analiz statystycznych do wyników przedstawionych w tabeli 14, 15, na rys. 56, 57, 59, 61, a w przypadku rys. 62, 63, 66 i 67 brakuje analizy statystycznej wskazującej istotność różnic uzyskanych efektów pomiędzy nanocząstkami opłaszczonymi vs nieopłaszczonymi oraz ewentualnie SFN a nanocząstkami opłaszczonymi. Dodatkowo, w przypadku analiz cytometrycznych zwykle pokazywane są reprezentatywne histogramy czy dot ploty, które umożliwiają wgląd w rzeczywisty obraz takiej analizy.

Na koniec chciałabym zwrócić uwagę na kilka drobnych uchybień związanych ze stosowaniem żargonu np. podanie „w żyłę” zamiast „do żyły” czy użyciem niezręcznego sformułowania jakim jest „terapia nowotworów”, czy skrótu myślowego: „cyrkulacja dootrzewnowa” itp. Jednakże, jak na tak obszerną pracę jest to znikoma liczba niezręczności, co świadczy o starannym przygotowaniu rozprawy przez Doktorantkę.

Podsumowując, Doktorantka prowadząc badania interdyscyplinarne, stosowała różnorodne techniki badawcze, w związku z tym praca jest obszerna i zawiera szereg informacji z odległych dziedzin nauki. W mojej opinii, autorka dobrze poradziła sobie z tym trudnym wyzwaniem, pracę czyta się z zainteresowaniem, a im większe zainteresowanie, tym więcej pojawia się zagadnień zachęcających do dyskusji, czy zadawania pytań. Ponadto, brak klasycznego rozdziału „dyskusja” pozostawił pewien niedosyt, stąd inna część moich pytań skierowanych do Doktorantki. Jednakże chciałam podkreślić, że realizując badania, autorka osiągnęła zamierzone cele, a więc uzyskała i przeprowadziła charakterystykę otrzymanych nanocząstek, a ich badania biologiczne wskazują na potencjalne interesujące możliwości ich zastosowania i otwierają pole do dalszych badań.

Wobec powyższego, uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Pamelii Krug pt. *„Otrzymywanie, charakterystyka fizykochemiczna i ocena aktywności przeciwnowotworowej nanocząstek seleniu i telluru modyfikowanych sulforafanem”* spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w *Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora*, tym samym wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani mgr Pamelii Krug do dalszych etapów przewodu doktorskiego.