



UNIWERSYTET
O P O L S K I

Prof.dr hab. inż. Tadeusz Janas
ZESPÓŁ BADAŃ EGZOSOMÓW I
LIPOSOMÓW
INSTYTUT BIOLOGII
ul. Kominka 6, 6a ; 45-032 Opole
tel. +48 77 401 60 50
fax. +48 77 401 60 51

18.11.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Lucyny Matusiewicz
„Immunoliposomowa forma simwastatyny jako potencjalny terapeutyk w leczeniu
nowotworów zależnych od EGFR”

wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra Sikorskiego,
promotor pomocniczy dr Joanna Podkalicka,
na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego
i przedstawiona Radzie Wydziału Biotechnologii na tym Uniwersytecie.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie zbiór: dwóch artykułów naukowo-badawczych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (Cancers (Basel), IF = 6.16, liczba punktów MNiSW= 140; International Journal of Pharmaceutics, IF = 4.21, liczba punktów MNiSW= 100), jednego artykułu przeglądowego opublikowanego w czasopiśmie Tumor Biology (IF = 2.93, liczba punktów MNiSW= 100) oraz jednego artykułu przeglądowego wysłanego do druku. W dorobku naukowym (który nie jest uwzględniony w rozprawie) Doktoranta, znajduje się też współautorstwo trzech artykułów w czasopismach: Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (IF = 1.11, liczba punktów MNiSW= 40), Journal of Controlled Release (IF = 7.88, liczba punktów MNiSW= 140) oraz International Journal of Nanomedicine (IF = 4.47, liczba punktów MNiSW= 140). Oceniam dorobek publikacyjny mgr Lucyny Matusiewicz bardzo wysoko. Doktorantka ponadto przedstawiła wyniki swoich badań na dwóch konferencjach międzynarodowych, jest też współautorem jednego zgłoszenia patentowego.

W artykułach uwzględnionych w rozprawie mgr Matusiewicz jest pierwszym współautorem. Doktorantka określiła swój wkład w ich powstanie odpowiednio na 80%, 65% i 80%. Doktorantka wykonała większość prac doświadczalnych, oraz miała udział w zaplanowaniu eksperymentów, analizie wyników i w przygotowaniu manuskryptów do publikacji. Oświadczenia współautorów potwierdzają istotny wkład mgr Matusiewicz w powstanie prac składających się na jej rozprawę doktorską. W przypadku artykułu przeglądowego wysłanego do druku Doktorantka jest jedynym autorem.

Rozprawa jest napisana w języku polskim, zawiera 98 stron, w tym streszczenie w języku polskim oraz w języku angielskim, wprowadzenie z dołączonymi dwiema pracami przeglądowymi w języku angielskim, założenia i cel badań, dwa artykuły doświadczalne w języku angielskim wraz ze streszczeniem wyników w języku polskim, dyskusję końcową, wnioski, spis literatury zawierający 20 pozycji. Spisy literatury w przedstawionych czterech publikacjach zawierają łącznie ponad 200 różnych pozycji.

Mgr Lucyna Matusiewicz przeprowadziła niezmiernie ważne, lecz bardzo trudne badania mające na celu opracowanie kierowanej za pomocą przeciwciał, liposomowej postaci simwastatyny jako leku w terapii przeciwnowotworowej raka piersi. Badania Doktorantki podzielone są na trzy etapy: etap 1 - zaprojektowanie konstrukcji liposomowej o wysokiej wydajności enkapsulacji leku, niskiej niespecyficznego cytotoksyczności oraz wysokiej stabilności; etap 2 – ocena wpływu liposomowej oraz immunoliposomowej formy leku na komórki wybranych linii nowotworów piersi; etap 3 – określenie selektywności i efektywności immunoliposomów *in vivo*. Należy podkreślić, że podjęte przez Doktorantkę badania są nowe i oryginalne. Chociaż

doniesienia na temat zastosowania liposomowych form statyn pojawiały się wcześniej, Doktorantka po raz pierwszy podjęła próbę kierowania immunoliposomów w stronę eceptorów z rodziny EGFR obecnych w błonach komórek nowotworowych pochodzenia epitelialnego.

Pierwsza praca doświadczalna składająca się na rozprawę doktorską [Immunoliposomes with Simvastatin as a Potential Therapeutic in Treatment of Breast Cancer Cells Overexpressing HER2-An In Vitro Study CANCERS, Volume 10, Article 418, (2018) Matusiewicz, Lucyna; Podkalicka, Joanna; Sikorski, Aleksander F.] zawiera opis badań *in vitro* formułacji liposomowych zawierających simwastatynę. Doktorantka scharakteryzowała liposomowe i immunoliposomowe postacie simwastatyny poprzez określenie średnicy, potencjału zeta, wydajności enkapsulacji, pojemności liposomów, ilości przyłączonych przeciwciał oraz stabilności preparatów. Potwierdziła również selektywność immunoliposomów wobec komórek ekspozujących receptor HER2, a także wykazała, że immunoliposomowa forma simwastatyny indukuje apoptozę komórek nowotworowych oraz hamuje szlaki sygnałowe zależne od kinaz.

Recenzent ma następujące pytania w związku z powyższymi badaniami:

- czy Doktorantka może podjąć próbę wyjaśnienia przyczyn cytoksyczności liposomów bez żadnych domieszek/modyfikacji (czyli tzw. pustych otoczek liposomowych), ale zawierających mało cholesterolu? Czy dane literaturowe lub badania Doktorantki wskazują na zależność pomiędzy procentową zawartością cholesterolu w błonach liposomów a preferencyjną drogą internalizacji liposomów przez komórki poprzez endocytozę lub fuzję?
- dlaczego Doktorantka wybrała do badań otoczki liposomowe o niskiej toksyczności dla komórek nowotworowych jeżeli celem badań by wytworzenie formułacji liposomowych toksycznych dla tych komórek? Czy dane literaturowe lub badania Doktorantki wskazują, że liposomy zawierające cholesterol wykazują taką samą (lub podobną) toksyczność dla komórek nowotworowych i komórek nie-nowotworowych?

Druga praca doświadczalna [EGFR-targeted immunoliposomes as a selective delivery system of simvastatin, with potential use in treatment of triple-negative breast cancers. International Journal of Pharmaceutics, Volume 569, Article 118605, (2019) Lucyna Matusiewicz, Beata Filip-Psurska, Mateusz Psurski, Sabina Tabaczar, Aleksander F. Sikorski] przynosi kontynuację badań immunoliposomowej formy simwastatyny, kierowanej tym razem na komórki zawierające wysoki poziom receptora EGFR na powierzchni błon. Doktorantka badania przeprowadziła zarówno na hodowlach komórkowych jak i w modelu *in vivo* z wykorzystaniem myszy. Wykazała, że znakowane fluorescencyjnie immunoliposomy obniżają uporządkowanie błon komórek, są kierowane do nowotworowych komórek docelowych u myszy i powodują zahamowanie wzrostu guza o ok. 25%. Uzyskane dane dotyczące zahamowania wzrostu guza u myszy nie były jednak istotne statystycznie.

Recenzent ma następujące pytania w związku z powyższymi badaniami. Zarówno w artykule w czasopiśmie International Journal of Pharmaceutics jak i w dyskusji końcowej w pracy doktorskiej jest zawarta uwaga, że w badaniach *in vitro* (na hodowach komórkowych) uzyskano obiecujące wyniki, które się nie potwierdziły w badaniach *in vivo* (na myszach). Rysunek 3 w artykule pokazuje, że ilość żywych komórek, w przypadku zastosowania immunoliposomów zawierających simwastatynę, zmniejszyła się po 12 godz. jedynie o ok 10% (w porównaniu z immunoliposomami bez simwastatyny), a po 48 godz. o ok. 50%. W cytowanej przez autorkę pracy Li i wsp. 2019 [Herceptin-conjugated liposomes co-loaded with doxorubicin and simvastatin in targeted prostate cancer therapy, Am J Transl Res 2019;11(3):1255-1269] autorzy pokazują, że maksimum koncentracji liposomów w guzie jest po ok. 8 godz od podania, a następnie koncentracja ta maleje. Przedstawione w powyższym artykule dane sugerują, że po 48 godz ilość liposomów w guzie jest wyraźnie zmniejszona. Dlatego można przypuszczać, że uzyskany przez autorkę wynik 25% zahamowania wzrostu guza odzwierciedla zmniejszenie koncentracji liposomów w obrębie guza, tym bardziej że podawano liposomy co 72 godziny. Czy dane literaturowe lub badania Doktorantki wskazują jak szybko użyte przez Doktorantkę (lub podobnie modyfikowane) immunoliposomy

zmniejszają swoją koncentrację w guzie? Co było podstawą wyboru częstotliwości podawania liposomów? Czy Doktorantka może podjąć próbę dyskusji ewentualnego efektu terapeutycznego dla krótszych odstępów czasowych podawania liposomów?

Ostatnia z publikacji składających się na rozprawę doktorską [The effect of statins on cancer cells—Review. Tumour Biol. 2015, 36, 4889–4904, Matuszewicz, L.; Meissner, J.; Toporkiewicz, M.; Sikorski, A.F.] oraz artykuł wysłany do druku są pracami przeglądowymi na temat prób wykorzystania statyn w terapiach przeciwnowotworowych oraz oceny ich skuteczności. Ponieważ Doktorantka w badaniach eksperymentalnych zajmowała się tą tematyką, dlatego prace te mogą stanowić integralną część rozprawy doktorskiej jako wstęp teoretyczny do badań.

Oceniam niezwykle wysoko rozprawę doktorską mgr Lucyny Matuszewicz. Doktorantka przeprowadziła wiele pracochłonnych analiz przy użyciu zaawansowanych technik eksperymentalnych, dokonała analizy wyników, i w efekcie otrzymała niezwykle wartościowe dane wskazujące na to, że immunoliposomowa forma simwastatyny prawdopodobnie może być wykorzystana jako forma wspomagania leczenia nowotworów zależnych od EGFR. Wykazała się też cennym krytycyzmem w stosunku do otrzymanych wyników. Z uwagi na bardzo wysoką wartość naukową badań Doktorantki oraz niezwykle ważne potencjalne ich zastosowania medyczne zwracam się do Rady Wydziału o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Reasumując wyrażam opinię, że przedłożona przez mgr Lucynę Matuszewicz rozprawa doktorska w pełni odpowiada warunkom Ustawy o stopniach i tytule naukowym, a dorobek naukowy kandydatki uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych. Zwracam się do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Lucyny Matuszewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego, oraz o wyróżnienie pracy doktorskiej.



Prof. dr hab. inż. Tadeusz Janas