

Olsztyn, 15.03.2023 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Górczak
„Przedkliniczne zastosowanie makrofagów jako nośniki leków do guzów litych”
pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Magdaleny Król

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Małgorzaty Górczak była walidacja, czy komórkowy system dostarczania substancji czynnej związanej z białkiem może stanowić skuteczny nośnik tego białka i prowadzi do eliminacji komórek nowotworowych w układzie in vitro oraz in vivo.

Choroby nowotworowe stanowią wyzwanie dla współczesnej medycyny. Pomimo intensywnie prowadzonych badań oraz pozyskanej wiedzy na temat nowotworów, zachorowalność oraz umieralność z roku na rok niestety wzrasta. W przypadku wielu nowotworów (szczególnie litych) podstawową metodą leczenia jest podawanie leków cytostatycznych, jednak ich skuteczność w niszczeniu komórek nowotworowych jest niesatysfakcjonująca między innymi ze względu na ogólnoustrojową toksyczność tych leków. Niestety ich działania niepożądane często przeważają nad korzyściami tego sposobu leczenia, a skuteczność leczenia jest ograniczona przez charakter zmian nowotworowych związany z mikrośrodowiskiem guza (litego).

Dlatego istotną sprawą w przygotowaniu terapii onkologicznej jest uwzględnienie jej skuteczności przez indywidualne dostosowanie z uwzględnieniem zakresu działania leku, ale również opracowanie metody jego podania przez wyeliminowanie jego niekorzystnego działania ogólnosystemowego na organizm ciężko chorych pacjentów.

W leczeniu nowotworów hematologicznych dobre efekty osiągnięto stosując immunoterapię CAR-T, jednak w przypadku guzów litych ta terapia nie wykazuje istotnej skuteczności, dlatego ważne jest dalsze poszukiwanie nowych i skutecznych sposobów leczenia pacjenta onkologicznego z uwzględnieniem jego indywidualnych potrzeb zdeterminowanych przez rodzaj choroby nowotworowej.

Okazuje się, że obiecujące jest zamykanie leków cytostatycznych wewnątrz różnych transporterów (np. białek), a następnie selektywne dostarczanie za pomocą komórek układu immunologicznego do określonych tkanek i komórek w celu zwiększenia ich efektu leczniczego. Doktorantka, użyła w swoich badaniach makrofagi, bo ze względu na swoje właściwości fizjologiczne są w stanie dotrzeć wszędzie tam gdzie nie dociera większość

substancji i komórek. Jako transporter leków zastosowała ferrytynę ze względu na funkcję i budowę tego białka. Jego 4-rzędowa struktura przypomina budowę sferyczną klatkę, wewnątrz której można było zamknąć leki cytostatyczne.

Praca doktorska przedstawiona mi do oceny powstała w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez ERC Starting Grant pt. "Zakładanie pułapki na niedotlenione guzy przez makrofagi załadowane HAP" oraz współpracy z firmą biotechnologiczną Cells Sp.z.o.o. W związku ze współpracą z tą firmą używano w badaniach opracowane w firmie Cells dwa koniugaty ferrytyny z lekami cytostatycznymi HFt-735 i HFt-250. Po inkubacji wymienionych koniugatów z makrofagami otrzymano odpowiednio MDC-735 oraz MDC-250, czyli makrofagi niosące wewnątrz komórki kompleksy ferrytyny z lekiem 735 lub lekiem 250.

Praca Pani mgr inż. Małgorzaty Górczak ma konstrukcję typową dla rozpraw doktorskich i obejmuje streszczenie w języku angielskim i polskim, listę zastosowanych skrótów, wstęp, założenie i cele pracy, materiały, metody doświadczalne, wyniki, dyskusję, wnioski oraz literaturę (liczącą 153 pozycji literaturowych anglojęzycznych, opublikowanych głównie w ostatnich 10 latach). Streszczenie zamieszczone w języku polskim i angielskim umożliwia szybkie zapoznanie się z problematyką i wynikami pracy.

Praca liczy 128 stron, obejmuje 49 rycin i 8 tabel. Rozprawa jest napisana poprawną polszczyzną, jednak w pracy pojawiają się nieliczne błędy interpunkcyjne i edytorskie. Te problemy edytorskie nie mają wpływu na zrozumienie i przejrzystość formy pracy.

„Wstęp” zawiera wprowadzenie do wszystkich ważnych wątków merytorycznych występujących w pracy. We „Wstępie” Doktorantka w bardzo ciekawy sposób wprowadza czytelnika w problem badawczy, którym zajęła się w dalszej części przygotowanej rozprawy doktorskiej.

Doktorantka posiada wszechstronny warsztat eksperymentatora. Zarówno tradycyjne jak i nowoczesne metody hodowli, przechowywania i analizy komórkowej, biologii molekularnej oraz badania na modelu zwierzęcym stosowane w tej pracy, są szczegółowo opisane w rozdziale „Metodyka”. W prowadzonych badaniach Doktorantka posługiwała się nowatorskimi narzędziami oraz umiejętnie zaprojektowała sposób ich użycia do osiągnięcia zamierzonego celu badawczego.

Doktorantka prowadziła badania *in vitro* na modelach pierwotnych ludzkich makrofagów, uzyskanych z monocytów wyizolowanych z kożuszków leukocyta-
płytkowych pochodzących z krwi obwodowej zdrowych pacjentów oraz komórkach

nowotworowych z linii komórkowych nowotworów ludzkich: potrójnie negatywnego raka piersi (MDA-MB-231), niedrobnokomórkowego raka płuc (A549) oraz raka jajnika (SKOV-3). Prowadziła również badania *in vivo* na myszach transgenicznym z niedoborem odporności. W badaniach używała zmodyfikowaną ludzką ferrytynę połączoną z odpowiednim znacznikiem fluorescencyjnym jak również z lekiem cytostatycznym, którą inkubowała z makrofagami lub monocytami, dzięki czemu uzyskano komórki MDC (Macrophage Drug Conjugate), wykorzystywane w eksperymentach z modelami zwierzęcymi.

„Wyniki” przedstawiono na 52 stronach w 6 podrozdziałach w formie opisowej w 1 obszernej tabeli i na 26 rycinach.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały, że:

- 1) makrofagi zachowują swoje właściwości podczas procesu kriokonserwacji, co w przyszłości może być istotne przy opracowywaniu zastosowania klinicznego,
- 2) makrofagi efektywniej od monocytów pobierają i przenoszą pobraną ferrytynę do komórek nowotworowych,
- 3) w eksperymentach *in vivo* potwierdzono, że makrofagi migrują do obszarów niedotlenionych wychodząc poza naczynia krwionośne,
- 4) kompleks ferrytyna-lek zamknięty wewnątrz makrofagów działa cytotoksycznie wobec komórek nowotworowych, ale nie powoduje przedwczesnego uszkodzenia makrofagów *in vitro*,
- 5) badane kompleksy HFt-735 i HFt-250 zamknięte wewnątrz makrofagów wykazują skuteczność wobec ludzkich modeli raka jajnika i raka trzustki w warunkach *in vivo*. MDC-735 wykazało korzystny wpływ na zahamowanie guza u myszy z wszczepionym rakiem jajnika (SK-OV-3), analogicznie MDC-250 w raku trzustki (BxPC3).

Uzyskane wyniki w ramach przedstawionej pracy stanowią znaczący wkład w badania nad poszukiwaniem skutecznej i bezpiecznej terapii z zastosowaniem leków cytostatycznych, uwzględniając specyfikę nowotworów oraz potrzeby pacjenta przez celowane podanie leku w bliskie sąsiedztwo guza.

W rozdziale „Dyskusja” zostały omówione i uzasadnione otrzymane wyniki badań. Autorka wykazała się dużą znajomością literatury w omawianej dziedzinie przy interpretacji wyników, o czym świadczy duża liczba odniesień naukowych (156 pozycji literaturowych). Cytowane piśmiennictwo zawiera aktualne dane dotyczące przedmiotu badań.

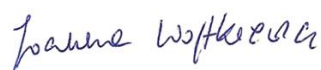
W recenzowanej pracy w rozdziale „Wnioski” Doktorantka w sposób zwięzły w punktach podsumowała uzyskane wyniki. W mojej opinii taki sposób prezentacji ułatwił całościowy odbiór pracy, ze względu na ogromną ilość bardzo cennych wyników. Doktorantka podkreśla w tym rozdziale, że leki cytostatyczne połączone z białkiem i umieszczone w komórce immunologicznej, mają bezpośredni wpływ na bezpieczeństwo terapii. Takie działanie zwiększa efektywność podawania cytostatyków bezpośrednio do zmienionej nowotworowo tkanki przez migrujące do niej makrofagi. To pozwala zmniejszyć dawkę substancji aktywnej cytostatyku, co będzie miało przełożenie na minimalizowanie wystąpienia działań niepożądanych terapii.

Moje krytyczne uwagi dotyczą pojedynczych błędów edytorskich (np. strona 22 end, a powinno być eng. itp.) oraz opisu niektórych rycin (np. ryciny 15, 16, gdzie zbyt małe napisy opisujące zdjęcia oraz małe zdjęcia sprawiają, że trudno na wydruku zaobserwować opisywane zmiany, a przez to są mało czytelne, jednak w wersji PDF jakość zdjęć jest znacząco lepsza). Moje krytyczne uwagi są znikome w porównaniu z wartością merytoryczną tej pracy i bogactwem metod zaprezentowanych przez Doktorantkę, dlatego nie zmieniają ogólnej bardzo dobrej oceny recenzowanej dysertacji.

Poddana recenzji praca doktorska ma duże znaczenie poznawcze oraz aplikacyjne, a jej wyniki są punktem wyjścia do dalszych badań nad zrozumieniem mechanizmów, które pozwolą w sposób efektywny i bezpieczny optymalizować metodę dostarczenia kompleksu ferrytyna-lek do miejsca docelowego, w celu wywołania pożądanego efektu terapeutycznego przy zminimalizowaniu niekorzystnych ogólnoustrojowych skutków związanych ze stosowaniem cytostatyków.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w stosownej ustawie (ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Górczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego przed Wysoką Radą Naukową Dyscypliny Nauk Biologicznych Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Instytut Biologii. Z uwagi na wysoką wartość poznawczą otrzymanych wyników oraz wyjątkową staranność w opracowaniu i przedstawieniu tak dużego materiału badawczego wnoszę o wyróżnienie przedstawionej pracy doktorskiej.

prof. dr. hab. n. med. Joanna Wojtkiewicz



Uzasadnienie wyróżnienia pracy doktorskiej Pani mgr inż. Małgorzaty Górczak
pt. „Przedkliniczne zastosowanie makrofagów jako nośnika leków do guzów litych”

Wnioskuje o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr inż. Małgorzaty Górczak.

W pracy doktorskiej prowadzono badania nad opracowaniem nowego systemu dostarczania leku połączonego z ferrytyną, który może być transportowany przez makrofagi przy leczeniu guzów litych. Przedstawione wyniki badań są obiecujące i mają znaczenie poznawcze oraz aplikacyjne dla rozwoju terapii onkologicznych przez wykorzystanie makrofagów do celowanego dostarczenia leku do chorobowo zmienionej tkanki przy eliminacji ogólnoustrojowych skutków niepożądanych u pacjenta onkologicznego, które są związane ze stosowaniem chemioterapii standardowej.

Ze względu na uzyskane wyniki i potencjał metody proponowanej przez Doktorantkę, istotne jest dalsze kontynuowanie badań przedklinicznych na modelach zwierzęcych.

Uzyskane wyniki mogą stać się w przyszłości punktem wyjścia do opracowania protokołów badawczych wykorzystywanych w dalszych etapach badań przedklinicznych, jak również mogą być podstawą do aplikowania o finansowanie zewnętrzne ze względu na wysoką wartość poznawczą oraz aplikacyjną.

prof. dr. hab. n. med. Joanna Wojtkiewicz

