



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, 2019-10-09

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk
Laboratorium Doświadczalnej
Terapii Przeciwnowotworowej

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Marcinkowskiej
pt. **Koniugaty dendrymeru PAMAM G4 z lekami przeciwnowotworowymi i
przeciwiałem monoklonalnym w badaniach in vitro**

wykonanej w Katedrze Biofizyki Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego
pod opieką promotora prof. dr hab. Barbary Klajnert-Maculewicz
oraz promotora pomocniczego dr hab. Anny Janaszewskiej

Selektywne dostarczanie leków przeciwnowotworowych do miejsc objętych zmianami złośliwymi jest wielkim wyzwaniem, z którym wciąż zмага się świat naukowy. Podstawowym problemem pozostaje brak jakościowych cech wyróżniających komórkę nowotworową spośród komórek zdrowych. Poznane dotąd różnice są natury ilościowej raczej niż jakościowej. Tak jest również w przypadku receptora HER2, który stał się przedmiotem zainteresowania Doktorantki. Jak okazało się w trakcie praktyki klinicznej dotyczącej stosowania trastuzumabu, a więc przeciwiała anty-HER2, jako leku przeciwnowotworowego, wykazuje on kardiotoxycznosc a efekty jego łącznego stosowania z klasycznymi chemioterapeutykami stosowanymi w raku piersi nie są zadowalające. Stąd słuszne zainteresowanie Doktorantki próbą stworzenia cząsteczki zawierającej jednocześnie jeden z klasycznych leków przeciwnowotworowych oraz trastuzumab (lek i jednocześnie cząsteczka zapewniająca pewną selektywność działania) umieszczone w nośniku w postaci dendrymerów, a konkretnie dendrymeru poliamidoaminowego czwartej generacji (PAMAM G4) w celu opracowania wielofunkcyjnego koniugatu, potencjalnie bardziej selektywnego i mniej toksycznego.

Autorka uzyskała trzy różne koniugaty PAMAM z następującymi lekami przeciwnowotworowymi: paklitakselem, docetakselem i doksorubicyną z przyłączonym trastuzumabem, poszukując najefektywniejszego układu o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym.

Praca doktorska składa się z 4 publikacji, w tym 3 oryginalnych i jednej przeglądowej w języku polskim, w których doktorantka jest pierwszą autorką. Po





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

analizie oświadczeń współautorów należy wnioskować, iż odegrała ona wiodącą rolę w ich powstawaniu (40-45% udziału).

Praca przeglądowa jest interesującym przeglądem danych literaturowych bezpośrednio dotyczącym tematu pracy doktorskiej. Mimo, iż została opublikowana w 2016 roku, z pewnością większość zawartych tam danych jest wciąż aktualna i obrazuje dobre umiejętności Doktorantki w zakresie krytycznej analizy danych piśmiennictwa naukowego.

Dwie publikacje oryginalne poświęcono syntezie i analizie aktywności biologicznej koniugatów z taksanami. Jednakże koniugaty, które służą jako kontrolne dla porównania aktywności samego trastuzumabu do aktywności PAMAM-trastuzumab i PAMAM-lek przeciwnowotworowy-trastuzumab, znaleźć można dopiero w publikacji dotyczącej doksorubicyny. Jest to najstarsza publikacja spośród prezentowanych prac oryginalnych, więc publikując kolejne prace, Autorka mogła odnosić się do danych w niej zawartych. Jednakże, jestem zwolennikiem bezpośredniego stosowania wszelkich niezbędnych kontroli w przebiegu każdego z eksperymentów. Tabela 1 w publikacji Polymers 2018 wyraźnie pokazuje olbrzymią przewagę aktywności PAMAM-dox-trastuzumab wobec komórek linii SKBR-3 ($IC_{50}=0.003$) nad PAMAM-trastuzumab ($IC_{50}=0.41$) oraz nad samą doksorubicyną ($IC_{50}=0.34$). Domyślam się, że jednostką są tutaj μM , gdyż autorka pominęła tę informację, zarówno w tabeli zawartej we wprowadzeniu, jak i w publikacjach. Wracając natomiast do koniugatów z taksanami: uzyskano wartości IC_{50} podobnego rzędu wielkości, jak w przypadku koniugatów z doksorubicyną, stąd przez analogię można wnioskować o wyższości takich konstrukcji wielolekowych nad pojedynczymi lekami. Podkreślić należy, iż jest to różnica wielkości kilku rzędów, a więc z pewnością imponująca i zachęcająca do dalszych badań. Dodatkowo, na szczególną uwagę zasługuje wysoka selektywność koniugatów wobec komórek z nadrekspresją HER2, a także ich stosunkowo niska toksyczność wobec komórek krwi.

Nie chcąc streszczać uzyskanych przez autorkę licznych i wartościowych wyników kolejnych badań, podsumuję jedynie, iż oprócz wspomnianych wyżej syntez oraz charakterystyki za pomocą technik NMR, FTIR oraz RP-HPLC otrzymanych koniugatów oraz ich wpływu na proliferację komórek nowotworowych i prawidłowych, autorka wykonała cały szereg analiz obrazujących wychwyty koniugatów przez komórki, ich wpływ na produkcję wolnych rodników, potencjał błony mitochondrialnej, aktywność kaspaz, apoptozę/nekrozę, cykl komórkowy wykorzystując bogaty wachlarz technik od mikroskopowych do cytometrii przepływowej. Ta szeroka charakterystyka zmierzająca także do oceny mechanizmów działania badanych koniugatów, dotyczy głównie koniugatów z taksanami i, co warto podkreślić, została wykonana zarówno na



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

komórkach SKBR-3 z nadekspresją HER2 i MCF-7 – nie wykazujących nadekspresji tego receptora.

Wszystkie te badania zostały opublikowane w czasopismach o dobrym IF (dwie prace w *Polymers* IF 3.681, jedna w *Pharmaceutical Research*, IF 3.896 oraz praca przeglądowa w *Postęпах Hig Med. Dosw.*, IF 0.633), zostały więc zweryfikowane przez niezależnych recenzentów. Mimo to, chciałam zwrócić uwagę na brak analizy statystycznej danych biologicznych (z wyjątkiem IC50), na co być może nie zwrócili uwagi recenzenci tych publikacji. Przeprowadzenie takich analiz, w mojej opinii wzmacnia wyciągane wnioski.

Mam także następujące pytanie: pomimo, iż autorka stwierdza, że przeprowadziła syntezę koniugatów PAMAM z lekami przeciwnowotworowymi (bez trastuzumabu) nigdzie jednakże wyników badań biologicznych dla takich koniugatów nie znalazłam. Chciałabym także, w ramach dyskusji dotyczącej uzyskanych wyników, zadać pytanie dotyczące różnic w aktywności np. względem indukcji wolnych rodników pomiędzy koniugatami z paklitakselem i docetakselem. Czy decyduje o tym mechanizm działania samego leku, czy też sposób jego uwalniania z koniugatów, czy inne cechy? Czy sprawdzono eksperymentalnie w różnym zakresie pH, w osoczu czy medium hodowlanym uwalnianie leku z dendrymerów?

Czy jest możliwe, że zaproponowana przez Doktorantkę forma podania 2 leków, jako koniugatów może doprowadzić do nasilenia toksyczności, zwłaszcza np. w przypadku koniugowania 2 kardiotoxycznych leków jak doksorubicyna i trastuzumab? Również taksany znane są z indukowania kardiotoxyczności, a w przypadku trastuzumabu istotną rolę może odgrywać fakt, że kardiomiocyty wykazują ekspresję receptorów HER2, choć, jak Doktorantka wspomina, mechanizmy odpowiedzialne za kardiotoxyczność trastuzumabu nie są do końca wyjaśnione.

Bardzo podoba mi się profesjonalny sposób przygotowania wprowadzenia do zagadnień będących tematem rozprawy doktorskiej. Autorka syntetycznie i wyczerpująco przedstawiła zarówno motywacje kierujące nią do zaprojektowania takich właśnie badań, a także streściła uzyskane wyniki wnioskując na ich podstawie, iż najlepszym układem jest układ zawierający docetaksel, jako ten o najlepszej selektywności względem komórek z nadekspresją HER2 i z zachowanymi mechanizmami działania wolnego leku.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Moniki Marcinkowskiej jest konsekwentnym interdyscyplinarnym opracowaniem naukowym opartym na dobrze sformułowanej hipotezie badawczej, opisującym drogę od syntezy do dość szczegółowej charakterystyki aktywności biologicznej otrzymanych koniugatów. Wyselekcjonowany, najaktywniejszy koniugat, cechuje się, oprócz szczególnie wysokiej aktywności wobec komórek z nadekspresją receptora HER2



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKI 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

również pewną wybiórczością, oszczędzającą komórki prawidłowe krwi. Są to więc wartościowe wyniki, które w przyszłości mogą doprowadzić do opracowania nowej strategii terapeutycznej opartej na znanych lekach, modyfikującej jednakże ich farmakodynamikę i farmakokinetykę. Ciekawe będą kolejne badania, zwłaszcza w modelach *in vivo* umożliwiające potwierdzenie licznych i cennych obserwacji pochodzących z ocenianej rozprawy.

Mgr Monika Marcinkowska jest bardzo aktywną, zarówno publikacyjnie, jak i w gromadzeniu funduszy na realizowane badania. Jest kierownikiem projektu Preludium, uczestniczy także w realizacji 3 innych projektów grantowych. Jej dorobek naukowy, oprócz czterech publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, zawiera 8 innych publikacji, 2 zgłoszenia patentowe oraz liczne streszczenia konferencyjne. Ponadto odbyła ona kilka staży naukowych we Francji w ramach programów Erasmus+, Polonium oraz COST.

Wobec tego stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Moniki Marcinkowskiej pt. ***Koniugaty dendrymeru PAMAM G4 z lekami przeciwnowotworowymi i przeciwciałem monoklonalnym w badaniach in vitro*** spełnia wymogi prawne stawiane tego typu opracowaniom i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Moniki Marcinkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wyróżniającą się, zarówno samą rozprawę doktorską, jak i cały dorobek naukowy Doktorantki oraz opublikowanie wartościowych wyników badań w bardzo dobrych czasopismach naukowych, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk
Kierownik Laboratorium
Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej