



Dr hab. Teresa Kral

Wrocław, 15.10.2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Marcinkowskiej zatytułowanej:
„Koniugaty dendrymeru PAMAM G4 z lekami przeciwnowotworowymi i przeciwciałem
monoklonalnym w badaniach in vitro”.**

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Biofizyki Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Klajnert-Maculewicz oraz promotora pomocniczego dr hab. Anny Janaszewskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa składa się z czterech opublikowanych prac:

1. Marcinkowska, M., Stanczyk, M., Janaszewska, A., Gajek, A., Ksiezak, M., Dzialak, P., Klajnert-Maculewicz, B. Molecular mechanisms of antitumor activity of PAMAM dendrimer conjugates with anticancer drugs and a monoclonal antibody. *Polymers*. 2019, 11(9), 1422.
2. Marcinkowska, M., Stanczyk, M., Janaszewska, A., Sobierajska, E., Chworoś, A., Klajnert-Maculewicz, B., Multicomponent conjugates of anticancer drugs and monoclonal antibody with PAMAM dendrimers to increase efficacy of HER-2 positive breast cancer therapy. *Pharmaceutical Research*. 2019, 36: 154.
3. Marcinkowska, M., Sobierajska, E., Stanczyk, M., Janaszewska, A., Chworoś, A., Klajnert-Maculewicz, B. Conjugate of PAMAM dendrimer, doxorubicin and monoclonal antibody – trastuzumab: The new approach of a well-known strategy. *Polymers*. 2018, 10 (2), 187.
4. Marcinkowska, M., Stańczyk, M., Klajnert-Maculewicz, B. Przeciwciała monoklonalne trastuzumab i dendrymery w terapii celowanej raka piersi. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2015, 69, 1313-1324.

Prace 1-3 to oryginalne prace badawcze w języku angielskim, które ukazały się w latach 2018-2019 w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym z IFs wynoszącymi 3,681, 3,896 i 3,681 co odpowiadało 100, 40 i 40 punktom MNiSW w latach publikacji. Czwarta praca jest pracą przeglądową w języku polskim (ze streszczeniem w języku angielskim) z IF wynoszącym 0,633 co odpowiada 15 punktom MNiSW z roku jej publikacji (2015). Wszystkie cztery prace mają charakter współautorski a udział Pani mgr Moniki Marcinkowskiej jako pierwszej autorki – zgodnie z załączonymi oświadczeniami współautorów – jest wyraźnie określony na 40-45% i obejmuje wszystkie etapy pracy naukowej: od współtworzenia koncepcji poszczególnych prac, przez syntezę i charakterystykę badanych związków, wykonanie zdjęć konfokalnych, analizę



danych, aż po przygotowanie prac do druku. Imponujący, co pragnę podkreślić, jest zarówno sumaryczny IF dla publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (11,981), jak i sumaryczny IF dla całości dorobku (48,614) Doktorantki.

Do cyklu ww. publikacji włączono dodatkowo 25 stron opracowania autorskiego Pani mgr Moniki Marcinkowskiej w języku polskim. Opracowanie to obejmuje następujące rozdziały: wprowadzenie wraz z jasno określonym celem pracy i hipotezą badawczą, materiały i metody, omówienie wyników z jednoczesną ich dyskusją, szczegółowym podsumowaniem a przede wszystkim, rzeczowo i zwięźle zredagowanym streszczeniem całości uzyskanych wyników w języku polskim i angielskim. W opracowaniu autorskim rozprawy doktorskiej zamieszczona jest również lista pozostałych ośmiu prac z dorobku, opublikowanych w czasopismach z listy JCR, których Pani mgr Monika Marcinkowska jest współautorem, podobnie jak 5 komunikatów konferencyjnych o zasięgu międzynarodowym i 17 komunikatów o zasięgu krajowym. Doktorantka jest też współautorem dwu zgłoszeń patentowych dotyczących sposobu otrzymywania koniugatów dendrymerów PAMAM generacji 4 do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia raka piersi. W latach 2016-2019 była kierownikiem projektu badawczego NCN PRELUDIUM. W latach 2018-2019 doktorantka odbyła trzy zagraniczne staże naukowe (łącznie czas pobytu to ok. 4 miesiące) w Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) w Tuluzie (Francja). Badania przedstawione w pracy doktorskiej prowadzone były w ramach projektów naukowych takich jak: Program Operacyjny Kapitał Ludzki, projekt NCN Preludium 10, COST Action oraz stypendiów indywidualnych uzyskanych w latach 2016, 2017, 2018 z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. To wszystko świadczy o ciągłym i wszechstronnym pogłębianiu doświadczenia naukowego, ale także o radzeniu sobie w realiach pozyskiwania funduszy na swoje badania. Dodatkowy aspekt gromadzenia doświadczeń stanowi fakt prowadzenia badań we współpracy naukowej z ośrodkami krajowymi i zagranicznymi, które są nie do przecenienia w poszerzaniu warsztatu badawczego i metodologicznego Doktorantki.

Pani mgr Monika Marcinkowska, prowadząc swoje badania, podjęła problematykę bardzo istotną z punktu widzenia zdrowia człowieka. Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym kobiet w Polsce. Według danych Centrum Onkologii - Krajowego Rejestru Nowotworów - liczba zachorowań przekroczyła 16 500 rocznie i wzrosła w ostatnich



dwóch dekadach o około 10 000 zachorowań rocznie. We współczesnej onkologii stosuje się coraz częściej tzw. wielodyscyplinarne leczenie skojarzone, które uwzględnia metody leczenia miejscowego (chirurgia i napromienianie) oraz systemowego (chemioterapia, hormonoterapia, terapia celowana molekularnie). Zastosowanie połączenia trastuzumabu, dendrymeru i leków pozwala na uzyskanie efektu terapii celowanej molekularnie oraz dostarczenie bezpośrednio do komórek nowotworowych wysokiej dawki leku. Koniugaty, i tu zgadzam się z Doktorantką, mogą być interesującą propozycją mogącą przynieść poprawę skuteczności terapii nowotworu raka piersi u kobiet.

Przechodząc do meritum, rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Marcinkowskiej dotyczy oceny skuteczności koniugatów dendrymerów PAMAM czwartej generacji z lekami przeciwnowotworowymi oraz selektywności tych koniugatów względem komórek nowotworowych z nadekspresją białka receptorowego HER2 w wyniku przyłączenia przeciwciała monoklonalnego w odniesieniu do wolnych leków przeciwnowotworowych. Przeprowadzone badania dotyczyły szerokiej grupy koniugatów dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM) z lekami z grupy antracyklin (doksorubicyna) i taksanów (docetaksel i paklitaksel) w poszukiwaniu najefektywniej działającego systemu przeciwnowotworowego, który dzięki przyłączonemu przeciwciału monoklonalnemu (trastuzumab) posiadałby zdolność selektywnego działania w terapii raka piersi z nadekspresją HER2.

Główną częścią, przedstawionej rozprawy doktorskiej, jest zbiór czterech, spójnych tematycznie, współautorskich artykułów naukowych. Każdy z artykułów został dostosowany do wymogów czasopisma i podlegał już procesowi recenzowania naukowego. Prezentowane prace opisują kolejne etapy pracy naukowej wykonanej przez Doktorantkę, a mianowicie:

- 1) Pomyślnie przeprowadzoną syntezę oraz ocenę czystości koniugatów dendrymeru PAMAM G4 z lekami przeciwnowotworowymi: PAMAM-doksorubicyna, -paklitaksel, -docetaksel, oraz koniugatów z przyłączonym kowalencyjnie przeciwciałem monoklonalnym: PAMAM-doksorubicyna-trastuzumab, PAMAM-paklitaksel-trastuzumab, PAMAM-docetaksel-trastuzumab, oraz kontrolny PAMAM-trastuzumab. W tym miejscu muszę podkreślić, że Doktorantka deklaruje samodzielność procesu syntezy ww. koniugatów, co świadczy o dojrzałości i samodzielności naukowej.



- 2) Dokonanie oceny cytotoksyczności ww. koniugatów dla dwóch linii komórek raka piersi SKBR-3 HER2-pozytywnej i MCF-7 HER2-negatywnej. Wyniki tych badań potwierdziły selektywność koniugatów dendrymeru PAMAM z lekami i trastuzumabem względem komórek z nadekspresją receptora HER2.
- 3) Określenie szybkości wnikania koniugatów do komórek nowotworowych oraz, przy zastosowaniu techniki mikroskopii konfokalnej, potwierdzono ich lokalizację w komórkach.
- 4) Porównanie mechanizmu działania najbardziej selektywnych koniugatów dendrymeru PAMAM z taksanami i trastuzumabem. Zbadano ich wpływ na powstawanie reaktywnych form tlenu, zmiany potencjału mitochondrialnego, aktywację kaspaz, indukcję apoptozy oraz rozkład faz cyklu komórkowego.

Uważam za godne podkreślenia dwa aspekty prowadzonych badań: ich konsekwencję i przejrzystość, dzięki czemu udało się uzyskać potwierdzenie hipotezy badawczej, iż koniugaty dendrymerów PAMAM z lekami przeciwnowotworowymi działają skuteczniej niż wolne leki, a dokoniugowanie przeciwciała monoklonalnego zapewnia selektywność koniugatów względem komórek nowotworowych z nadekspresją receptora HER2 na powierzchni ich błony komórkowej. Na podstawie badań wyłoniono układ mający największy potencjał terapeutyczny w leczeniu raka piersi z nadekspresją receptora HER2 – koniugat PAMAM-docetaksel-trastuzumab.

Wyniki przeprowadzonych badań nie tylko wnoszą nowe informacje na temat działania samych koniugatów, ale także dają szansę zwiększenia skuteczności leczenia przy jednoczesnym zmniejszeniu toksyczności terapeutyków względem komórek prawidłowych. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są wartościowe ze względu na ich aspekt poznawczy i mają ponadto znaczenie aplikacyjne, mogą być wykorzystane w projektowaniu dalszych koniugatów „dendrymer PAMAM - lek przeciwnowotworowy - przeciwciało monoklonalne”. Wszystko to świadczy o niezwyklej pracowitości i zaangażowaniu w pracę naukową Doktorantki, a także o tym, iż zapoznała się Ona bardzo dobrze z realizowaną tematyką i opanowała szereg metod badawczych.



Z obowiązku recenzenta mam kilka uwag i wątpliwości, na które natknęłam się w opracowaniu autorskim Doktorantki:

- 1) Zabrakło w nim zebrania literatury w formie listy, na końcu opracowania. Cytowane publikacje są skrótowo wymieniane w stopce, co w pewnym stopniu utrudnia dotarcie do prac źródłowych.
- 2) Trudno też nie zauważyć drobnych „literówek”, np. str. 9, wiersz 13, zamiast „i” mamy „and”. Jednakże muszę bardzo wyraźnie podkreślić, że opracowanie jest napisane w sposób bardzo zwięzły i rzeczowy. Czyta się je naprawdę z przyjemnością, mając wrażenie, że znalazły się w nim tylko informacje najważniejsze.
- 3) W podrozdziale opracowania „Materiały i metody” wspomniana jest tylko Annexin V, bez wymieniania że to była Annexin V-FITC. Jest to jednak różnica, bo Annexin V-FITC, został wykorzystany jako znacznik fluorescencyjny, co znajdujemy w pracach będących przedmiotem rozprawy doktorskiej.
- 4) Zaprezentowana Tabela 1 (Str. 11) nie zawiera jednostki parametru cytotoksyczności, IC_{50} , którego jednostką domyślnie są mol/dm^3 . Wielkości zaprezentowane w tabeli wartości wydają się zbyt duże by to były mol/dm^3 . Z analizy publikacji wynika, że były to stężenia rzędu $1 \times 10^{-6} mol/dm^3$. Warto uzupełniać jednostki na każdym etapie opracowywania danych, bo to ułatwia śledzenie zmian tych wielkości.
- 5) Pytanie, które nasuwa mi się analizując zdjęcia konfokalne to, czy nie właściwszym byłoby zastosowanie laserów wzbudzenia 488nm i 532nm zamiast 405nm? Laser o długości wzbudzenia 405nm dla znaczników fluorescencyjnych Annexin V-FITC oraz PI (Propidium Iodide) skutkuje niskim poziomem emisji fluorescencji obu znaczników.
5.1. Czy w pomiarach konfokalnych na komórkach mierzona była moc lasera na obiektywie mikroskopu? Zbyt duża dawka światła wzbudzenia lasera destrukcyjnie wpływa na obiekt badania, w tym przypadku komórki.
- 6) Na koniec pytanie, czy planowane są badania in vivo ww. koniugatów, np. badania kliniczne?



Reasumując, rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Marcinkowskiej pt. „Koniugaty dendrymeru PAMAM G4 z lekami przeciwnowotworowymi i przeciwciałem monoklonalnym w badaniach in vitro” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wskazuje na głęboką wiedzę teoretyczną kandydatki w zakresie medycyny, biologii i biochemii oraz umiejętność prowadzenia pracy naukowej, począwszy od etapu planowania, poprzez wykonanie zadań badawczych, aż do opracowania i interpretacji wyników.

Rozprawa składająca się z czterech publikacji, z których trzy ukazały się w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, jest spójna pod względem merytorycznym i redakcyjnym. Praca wnosi nowe informacje i tezy do dalszych dyskusji i badań nad koniugatami „dendrymer PAMAM - lek przeciwnowotworowy - przeciwciała monoklonalne”. Wykonanie tak szeroko zakrojonych badań na każdym z etapów badawczych, począwszy od charakterystyki samych koniugatów, przez ocenę ich czystości, cytotoksyczności w obecności komórek ludzkich z i brakiem nadekspresji białka HER2 i wreszcie, co wydaje się najtrudniejsze, na ocenie efektywności wnikania i lokalizacji koniugatów w poszczególnych przedziałach komórkowych, skłania mnie do stwierdzenia, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim zgodnie z przepisami wprowadzającymi ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art. 179, punkt 3 (Dz.U. 2018 poz. 1669 Ustawa z dnia 3 lipca 2018 roku).

Zwracam się zatem uprzejmie do Komisji ds. Stopni w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Moniki Marcinkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Zważywszy na bardzo dobry dorobek naukowy Doktorantki oraz jakość i znaczenie przeprowadzonych przez Nią badań, zwracam się uprzejmie o wyróżnienie ocenianej rozprawy.

Wrocław, 15.10.2019

Dr hab. Teresa Kral