

Wrocław, 14.04.2023

dr hab. inż. Magdalena Przybyło, prof. PWr

Politechnika Wrocławska

Katedra Inżynierii Biomedycznej

Pl. Grunwaldzki 13, 50-377 Wrocław

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Małgorzaty Górczak
zatytułowanej „Przedkliniczne zastosowanie makrofagów jako nośnika
leków do guzów litych”

Informacje ogólne

Przedmiotem recenzji jest dysertacja doktorska pani mgr inż. Małgorzaty Górczak pt. „Przedkliniczne zastosowanie makrofagów jako nośnika leków do guzów litych” wykonanej pod kierunkiem promotora pani prof. dr hab. Magdaleny Król, oraz promotora pomocniczego pana dr inż. Bartłomieja Taciaka, w Samodzielnej Pracowni Biologii Nowotworu, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Podstawa prawna recenzji opiera się na określeniu czy spełnia ona wymogi określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574, z późn. Zm.).

Ocena merytoryczna pracy

Rozprawa doktorska pani Małgorzaty Górczak dotyczy walidacji systemu komórkowego dostarczania substancji czynnej związanej z białkiem ferrytyną celem potwierdzenia czy taki kompleks może stanowić skuteczny nośnik tego białka w konsekwencji prowadząc do eliminacji komórek nowotworowych w układzie in-vitro oraz in-vivo. Doktorantka zaproponowała jako nośnik model pierwotnych ludzkich makrofagów uzyskanych z monocytów wyizolowanych z kożuszków leukocyтарно- płytkowych pochodzących z krwi obwodowej zdrowych pacjentów, w którym zamykała kompleksy białka ferrytyny z lekiem cytotoksycznym.

Założenia oraz cel pracy, zaprezentowane ogólnie w Streszczeniu pracy, a następnie uszczegółowione w rozdziale 2, sformułowane zostały jednoznacznie i precyzyjnie a wyniki badań naukowych prowadzonych w tak określonym celu stanowią element nowy i oryginalny zarówno w zakresie wiedzy o biologii nowotworu jak i nowych podejściach farmakologicznych jego leczenia, celem zwiększenia skuteczności jak i poprawy bezpieczeństwa terapii przeciwnowotworowej. Z przedstawionego przez Doktorantkę opisu można jednoznacznie wskazać tezę pracy, jaką jest możliwość generowania efektu cytotoksycznego wobec komórek nowotworowych z jednoczesnym niskim poziomem cytotoksyczności względem samego nośnika, w zaproponowanym modelu farmakologicznym

obejmującym kompleks leku cytotoksycznego zamkniętego w makrofagach oraz jego zdolność do wnikania do guza.

Zaprezentowane w pracy wyniki badań, opisane w sposób rzetelny i szczegółowy, wskazują iż cel pracy został osiągnięty a wiedza pozyskana w trakcie jej realizacji stanowi cenny materiał badawczy jako wkład do dalszego rozwoju zaproponowanej strategii farmakologicznej. W mojej opinii jest to praca bardzo ważna a przedstawione wyniki, uwzględniające elementy oceny stabilności badanych nośników, pokazują iż badania mają charakter aplikacyjny.

Znaczenie podjętych przez Doktorantkę badań, zostało przez nią właściwie umotywowane w pierwszej części Streszczenia pracy a następnie w szeroko opisanym rozdziale 1 - Wstęp. Doktorantka w rozdziale 1 scharakteryzowała nowotwory, komórki których wykorzystano w badaniach, na bazie dostępnej literatury tj. potrójnie negatywny rak piersi, niedrobnokomórkowy rak płuc, rak trzustki oraz rak jajnika. W opisach przedstawiono podstawowe informacje o nowotworach, ich diagnostyce, oraz obecne schematy leczenia. W podrozdziale 1.2 scharakteryzowano makrofagi oraz przedstawiono stan wiedzy istotny dla pracy w zakresie zdolności makrofagów do migracji do stanów zapalnych, silnego różnicowania ich fenotypu w zależności od zmiennych parametrów środowiska, w tym w obrębie guza litego. W podrozdziale 1.3 Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała warunki hipoksji jakie towarzyszą guzom litym, oraz zdolnościom adaptacyjnym komórek nowotworowych w takim środowisku. Doktorantka odniosła się również do prób wykorzystania tych warunków w terapii przeciwnowotworowej.

Zakres tematyczny zaprezentowanych w rozdziale 1 informacji wstępnych został dobrany właściwie, na bazie obszernego piśmiennictwa w tematyce pracy. To świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę umiejętności wyszukiwania, selekcjonowania i syntezy informacji zawartych w źródłach naukowych. Przedstawione opisy są zwięzłe i rzeczowe jednocześnie wyczerpujące kluczowe wyniki badań.

Rozdział 2 przedstawia wspomniane wcześniej założenia i cele pracy. Rozdział 3 rozpoczyna część dysertacji, w której Doktorantka prezentuje metodykę i wyniki własnych prac doświadczalnych. W rozdziale 3 przedstawiono nowotworowe linie komórkowe wykorzystane do badań, opisano szczegółowo pozyskiwanie monocytów z kożuszków płytkowo-leukocytarnych, również w kontekście regulacji prawnych dotyczących materiałów pochodzących od dawców krwi. Doktorantka przedstawiła model zwierzęcy wykorzystany do badań, pochodzenie białka rekombinowane ferrytyny oraz leków cytotoksycznych kompleksowanych z białkiem. Z opisów przedstawionych w pracy wynika, iż były to gotowe materiały dostarczone do badań. Nazwy leków kompleksowane z białkiem nie zostały przez Doktorantkę ujawnione argumentując iż są objęte patentem. Jednak jeśli lek jest już objęty patentem z całą pewnością znajduje się w domenie publicznej więc fakt ten nie stanowi podstawy do nieujawniania nazwy leku. W dalszej części rozdziału przedstawiono w formie listy wykorzystane odczynniki, roztwory, aparaturę oraz materiały pomocnicze. Niewątpliwie wszystkie kluczowe informacje zawarto w opisie. W Rozdziale 4 Doktorantka zaprezentowała metody doświadczalne i protokoły jakie zastosowała w swoich badaniach w zakresie hodowli komórkowych. W tym miejscu jedynie zabrakło informacji czy opisane metody stanowią autorskie podejście czy też postępowano zgodnie z procedurami np.

producenta czy znalezionymi w literaturze. Tej informacji zabrakło również w części opisującej izolację jednojądrzastych komórek krwi obwodowej, choć można ją znaleźć we wnioskach na końcu pracy. Dla czytającego dodanie cytowania już przy opisie byłoby korzystniejsze. Pojawiła się natomiast w opisie pozyskiwania monocytów wykazujących ekspresję receptora CD14 w podrozdziale 4.1.5. Doktorantka opisała protokoły różnicowania makrofagów w kierunkach M1 oraz M2. Przedstawiono protokół znakowania białka za pomocą sondy fluorescencyjnej Alexa Fluor - 488, jednak tutaj również zabrakło informacji czy są to autorskie protokoły czy też zgodne z opisem producenta czy danych literaturowych. Dwa rozdziały: 4 oraz 4.3 nazwano jako „Metody doświadczalne” co nie jest to do końca spójnie w kontekście całego rozdziału. W podrozdziale 4.3 Doktorantka przedstawiła protokoły oznaczania zmiany markerów charakterystycznych dla różnych populacji makrofagów korzystając ze znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał, opisanych uprzednio w podrozdziale 3.5. W przypadku przeciwciała CD11B w opisie podrozdziału 3.5 pojawia się informacja iż było znakowane fluorochromem Alexa 488 natomiast w tabeli 4 jest informacja, że był to FITC, CD16 w rozdziale 3.5 podano iż było znakowane FITC w tabeli 4 jest znacznik APC, CD206 ma również inne znaczniki.

1. *Nie jest do końca jasne z opisu czy do oznaczania zmiany markerów został wybrany inny zestaw przeciwciał stąd też pojawiła się dodatkowa lista w tabeli 4. Jeśli tak to nie ma w niej źródła pochodzenia przeciwciał, tak jak na liście w rozdziale 3.5.*
2. *Rozdział 4.3.10 - Dwa modele mikroskopu konfokalnego - TCS SP5 Leica i raz Leica TCS SP115. Na liście sprzętu jest wymieniony jeden mikroskop; nie ma komentarza czemu zmieniono obiektyw z 60x na 63x oraz dlaczego raz zwrócono uwagę na aperturę numeryczną a raz pominięto.*

W rozdziale 4.4 opisano badania na modelu in-vivo, podając szczegółowo informacje dotyczące protokołu badania na myszach.

Dla oceny indywidualnych osiągnięć naukowych Doktorantki najważniejszy jest rozdział 5 rozprawy, w którym zostały przedstawione wyniki własne. Rozdział 5 rozpoczyna się od zaprezentowania efektów uzysku monocytów z kożuszków płytkowo-leukocytarnych. Z zaprezentowanych danych wynika iż na podstawie opracowanego przez Doktorantkę protokołu otrzymywane są monocyty z 99% ekspresją antygenu CD14 oraz 98% żywotnością. W kolejnym kroku Doktorantka przeprowadziła badania porównawcze warunków hodowli makrofagów w funkcji rodzaju surowicy użytej do badania, określając optymalne warunki ich hodowli na poziomie 10% FBS .

3. *Proszę o komentarz dlaczego ludzkie makrofagi rosną lepiej w surowicy wołowej niż ludzkiej zwłaszcza, że porównano dwie zmienne na raz: typ surowicy i stężenie tj FBS miała 10% a HS 5% .*

W kolejnym etapie określono zmiany jakie zachodzą w poziomie ekspresji wybranych antygenów powierzchniowych w trakcie 7 dniowego różnicowania monocytów do makrofagów.

4. *Dlaczego liczona jest średnia geometryczna intensywności fluorescencji dla danego punktu czasowego badania ?*

Określono również zmiany w ekspresji antygenów powierzchniowych w trzech punktach czasowych. Wskazano na podstawie analizy statystycznej, poziomy których antygenów rosną a których maleją.

5. Na Rys.18 Dla PD-L1 nie widać wartości mediany.

W mojej opinii, w kontekście aplikacyjnego charakteru pracy i przyszłych zastosowań, bardzo ważnym aspektem było przeprowadzenie powyższych badań w funkcji stabilności ekspresji antygenów po zamrożeniu komórek.

6. Proszę o wskazanie czasu mrożenia. Brakuje go w opisie.

Doktorantka przedstawiła wyniki eksperymentu migracji makrofagów określone jako wartości średnie intensywności. Z racji słabej jakości wydruku zdjęć z mikroskopii fluorescencyjnej dane rzeczywiste można ocenić w ograniczonym zakresie. Projekt doświadczenia w oparciu o analizę danych względem wartości kontrolnych pozwala jednak stwierdzić wyraźne zmiany statystyczne w obrazach przedstawione na Ryc.22.

7. Brakuje opisu metodologii obliczania wartości średniej geometrycznej z obrazu.

Doktorantka przedstawiła również wyniki wskazujące na wyraźnie większą internalizację ferrytyny wolnej, przez makrofagi w porównaniu do monocytów. Wykazano również zdolność obu typów komórek do przekazywania internalizowanej ferrytyny do komórek nowotworowych w oparciu o badania techniką cytometrii jak również techniką mikroskopii konfokalnej co stanowi bardzo dobre uzupełnienie. Z zaprezentowanych zdjęć wynika wyraźnie, że proces ma miejsce dla białka przekazywanego przez makrofagi. Doktorantka dodatkowo zbadała jak na ten proces wpływa stymulacja makrofagów trzema czynnikami: M-CSF, IL-4 i CCL2. W badaniu nie wykazano różnic w internalizacji. Z wyników przedstawionych przez Doktorantkę można uznać iż w pewnym przedziale stężeń białka dla procesu internalizacji nie ma znaczenia proces krioprezerwacji, co jest cennym wynikiem, z punktu widzenia rozwoju tego podejścia farmakologicznego do postaci leku. Oceniono również wpływ czasu inkubacji oraz stężenia białka. Doktorantka w badaniach kompleksu lek-białko określiła także brak toksyczności kompleksu względem makrofagów a następnie przedstawiła wyniki obrazujące cytotoksyczność kompleksu białko-lek-makrofag na wybrane komórki nowotworowe. W badaniach uwzględniono również makrofagi, które uprzednio poddano krioprezerwacji, wykazując przy tym utrzymanie efektu cytotoksycznego względem komórek nowotworowych.

Wykazana efektywność kompleksu zaprezentowana w badaniach in-vitro ma potwierdzenie w zaproponowanych badaniach in-vivo na myszach. Przedstawione w pracy wyniki badań poparte kompleksową analizą statystyczną potwierdzają jednoznacznie tezy zaproponowane w rozprawie doktorskiej, trafnie przedstawione we wnioskach i mające uzasadnienie w przeprowadzonej dyskusji.

Język i formalna strona rozprawy

Praca napisana jest poprawnym, zrozumiałym językiem oraz poprawnie od strony redakcyjnej. Przedstawione zagadnienia opisano w sposób zrozumiały i rzeczowy jednocześnie wyczerpujący. Materiały źródłowe w sposób właściwy potwierdzają stawiane tezy. Wyniki w postaci wykresów przygotowane są starannie i zawierają niezbędne informacje. W wersji drukowanej zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego nie są do końca czytelne. Od strony formalnej praca spełnia wszystkie wymagania stawiane obecnie rozprawom doktorskim.

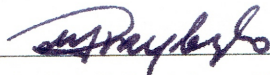
Wnioski

Na podstawie przeprowadzonej oceny pracy, stwierdzam iż rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Górczak pt. Przedkliniczne zastosowanie makrofagów jako nośnika leków guzów litych stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim jest wykazanie efektywności dostarczania leku cytostatycznego w kompleksie z ferrytyną przez makrofagi. Zaprezentowana praca wykazuje iż mgr Górczak posiada szeroką wiedzę w dyscyplinie nauk biologicznych oraz potwierdza jej umiejętności do prowadzenia samodzielnej pracy naukowej. Tym samym spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574, z późn. zm.).

Na szczególne wyróżnienie zasługują:

- szeroki wachlarz zastosowanych metod badawczych zarówno od w zakresie technik biologii komórki, technik obrazowania w metodach in-vitro oraz in-vivo
- ważny i aktualny temat pracy badawczej
- kompleksowe ujęcie tematu z systematycznymi badaniami
- umiejętność samodzielnego formułowania wniosków

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi zapisane w w/w ustawie i wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. inż. Magdalena Przybyło, prof. PWr