

Bydgoszcz dn. 23.10.2020

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Mileny Czajki

Ocenę przygotowano w związku z pismem URN/RDNF/5910/724-01/20 z dnia 10.09.2020 Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych WUM, prof. dr hab. n. farm. Marcina Sobczaka zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 08.09.2020.

Podstawą ubiegania się Pani mgr Mileny Czajki o stopień naukowy doktora jest monografia zatytułowana „Rekombinowane wektory wirusowe AAV w obrazowaniu molekularnym komórek nowotworowych”, która powstała pod kierunkiem prof. dr hab. n. farm. Macieja Małeckiego. Badania przedstawione w dysertacji realizowane były w ramach grantu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju Strategmed 1/233264/4/NCBR/2014, MentorEYE. Doktorantka podejmuje w swojej pracy ważny temat poszukiwania efektywnych wektorowych nośników genów, które w dalszej perspektywie miałyby się przyczynić do lepszej diagnostyki i terapii onkologicznej. Tematyka wpisuje się w bieżące trendy naukowe: (1) rozwijanie strategii obrazowania komórek nowotworowych opartej o rekombinowane wektory AAV w odniesieniu do przerzutującego czerniaka oraz (2) propozycji nieinwazyjnej, przenosowej drogi podania wektora. Wyniki pracy wskazują na efektywne dostarczenie wektora do płuc w celu znakowania komórek czerniaka, co może być silnym atutem badanej technologii.

Rozprawa doktorska posiada układ typowej monografii, zawiera 247 stron i stanowi spójną całość. Część merytoryczna zaczyna się wykazem skrótów, a następnie we Wstępie autorka przybliży czytelnikowi zagadnienia związane z tematem pracy: rekombinowanymi wirusami związanymi z adenowirusami, wektorami niewirusowymi oraz czerniakiem. W sumie na 53 stronach zawartych zostało dużo skondensowanych informacji pozwalających zapoznać się z aktualnym stanem wiedzy i zrozumieć motywację podjętych badań. W kolejnym rozdziale

przetawionych zostało pięć celów pracy, które były tożsame z kolejnymi etapami badań. Przedstawione założenia były jasne i spójne, jakkolwiek w mojej ocenie mogłyby stanowić uszczegółowienie nadrzędnego celu pracy, który *de facto* znalazł się w artykule opublikowanym na podstawie badań Pani mgr Czajki w czasopiśmie *Anticancer Research* 40: 4425-4444 (2020). Uwaga ta jest czysto techniczna i nie wpływa na ogólną ocenę pracy.

Kolejny rozdział to przedstawienie metodologii użytej w badaniach. Kilka uwag dotyczących tej części pracy:

- brak parametrów wirowania w wielu procedurach (np. str. 85- wirowanie komórek bakteryjnych, str. 92- przygotowanie preparatów genowych, str. 95 przygotowanie kompleksów nośników transfekcyjnych). Ponadto, w wykazie materiałów lub dalej w materiałach i metodach warto wspomnieć o modelu wirówki, kącie nachylenia probówek do wimnika oraz/lub modelach użytych probówek i adapterów. Są to kluczowe parametry wirowania i mogą wpłynąć na ilość oraz jakość uzyskanego materiału badawczego.
- str. 90- rozdz. 2.4; wykazano w jaki sposób optymalizowano liczbę komórek. Z dalszych opisów nie wynika jednak optymalna liczba komórek. Czy do transdukcji komórek wysiewano ilości komórek wynikające z doświadczenia optymalizacji (tj. 5×10^4 dla linii komórkowej B16-F10 i 1×10^5 dla linii komórkowej NIH/3T3)? Czy do optymalizacji kompleksów nośników również wysiewano ilości komórek wynikające z doświadczenia optymalizacji? Pomimo podobnych parametrów tego doświadczenia (płytką 6 cm, 24 h przed transdukcją) - wysiane liczby komórek są inne ($\times 10^5$ /płytkę dla komórek nowotworowych oraz 3×10^5 /płytkę dla komórek prawidłowych).
- str. 91, rozdz. 2.4; opisano sposób transdukcji komórek, ale co to znaczy stwierdzenie „Na następny dzień przed podaniem rAAV policzono liczbę komórek” - czy to było następnego dnia po wysianiu komórek? Co to znaczy „Następnie podano wektory (...)”, - czy transdukcja była prowadzona niezwłocznie po liczeniu komórek? Czy raczej transfekowano komórki dokładnie przy liczbie 8×10^4 dla B16-F10, a $1,3 \times 10^5$ dla NIH/3T3? Z opisów nie wynika to wprost, proszę o doprecyzowanie.
- str. 89- rozdz. 2.3. – opisano ogólnie sposób prowadzenia hodowli komórek, w tym procedurę pasażowania. Dalej w opisach metodycznych i wynikach brak informacji o tym, które pasażę komórek wykorzystano do poszczególnych procedur transdukcji, chociaż wiadomo, że liczba pasaży wpływa na wydajność i jakość hodowli oraz transfekcji, co Autorka sama przytacza na końcu dyskusji.

- str. 132- rozdz. 5.2.- brak parametrów dobranych w celu liczenia badanych linii komórkowych (wielkość, kształt, natężenie światła, intensywność świecenia). W ilu powtórzeniach dokonywano pomiaru (ile slajdów/ na próbkę)?

Kolejne rozdziały zawierają prezentację i omówienie uzyskanych wyników. Autorka przedstawia je w sposób rzetelny i logiczny jakkolwiek nasuwa się kilka uwag/pytań:

- str.161- rozdz. 3.1.1- przeprowadzono transdukcję komórek przy użyciu dziesięciu różnych serotypów wirusów związanych z adenowirusami. Jednoznacznie wskazano (i przewidziano), że zmiana promotora wpływa na wydajność ekspresji przy użyciu wektorów rAAV. Wobec tego, dlaczego tylko do dwóch serotypów rAAV2/2 oraz rAAV/DJ zastosowano różne promotory: CMV i CAG, a pozostałe wektory były tylko pod promotorem CMV (słabszym, jak tutaj wykazano)?

- str. 169- rozdz. 3.1.2.1 - przedstawiono zasadę mikroskopowej oceny wydajności transfekcji; czy przy oznaczeniach +, ++, +++ chodzi o 20 komórek, 30 komórek itd., czy o 20% , 30% itd. komórek świecących? Z uwagi na sporo niedociągnięć edytorskich w tekście, proszę o weryfikację. Ponadto, brakuje informacji o metodzie wyboru pola widzenia w ocenie fluorescencji.

- str. 188 – rozdz. 3.2.8- ocena biobezpieczeństwa preparatów: to zagadnienie wydaje się być jednym z celów pracy (co autorka wymienia m.in. w dyskusji i wnioskach), jednak w metodologii brakuje odpowiedniego rozdziału.

Odniesienia dotyczące dyskusji:

- proszę uzasadnić dobór/wskazać kryteria doboru serotypów wirusów do badanych wektorów w pracy i dobór plazmidów niewirusowych.

- na str. 209 Autorka pisze: „Niniejsza praca doktorska zakłada użycie rekombinowanych wektorów rAAV, które selektywnie znakują komórki czerniaka mysiego B16-F10”. Może warto byłoby sprecyzować, że selektywność dotyczy znakowania komórek nowotworowych a nie tylko komórek B16-F10, które stanowiły jedynie model w prowadzonych badaniach.

- w badaniach zastosowano klasyczny znacznik fluorescencyjny białka zielonej fluorescencji eGFP, który znacznie obciąża wektor o i tak niskiej pojemności pakowania transgenów (ok. 4.7 kb). Doktorantka proponuje wprowadzić zastosowanie silnych promotorów (CMV, CAG), ale może warto zwrócić się także ku znacznikom o mniejszym ‘ciężarze’ w konstrukcie genowym, co również może poprawić transdukcyjność wektora?

Następną sekcją pracy były wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań i analiz. Wnioski zostały sformułowane konkretnie i logicznie i są adekwatne do uzyskanych wyników. Spis wykorzystanego w dysertacji piśmiennictwa zebrany jest na 22 stronach i stanowi 325 pozycji, z czego większość to prace anglojęzyczne z ostatnich kilku lat. Świadczy to po pierwsze o doskonałym przygotowaniu teoretycznym Autorki do podjęcia się pracy nad wybranym tematem, a po drugie pokazuje jego aktualność. Niestety, nie zabrakło błędów typowo edytorskich tzn. braku konsystencji w formatowaniu poszczególnych pozycji np. w poz. 229 część imion autorów przedstawiona jest poprawnie jako inicjały po nazwisku danej osoby, a część jako pełne imiona poprzedzające nazwiska.

Kolejnymi częściami dysertacji jest Spis rycin i tabel. Zarówno ryciny jak i tabele występują w pracy w imponującej ilości tj. odpowiednio 78 i 62 znacząco uzupełniając i wzbogacając treść pracy.

Z obowiązku edytora wnoszę kilka uwag i sugestii edytorskich:

- str. 92 - nie „wydajność optymalizacji transfekcji”, ale „wydajność transfekcji”
- str. 88 - nie „robiono im zdjęcia”, ale „fotografowano”, „prowadzono dokumentację zdjęciową”
- wielokrotnie wymieniane w tekście receptory to „toll-podobne” a nie „troll- podobne” oraz sporo innych błędów edytorskich, gramatycznych i stylistycznych, które wymagają bardzo skrupulatnego przeczytania całego tekstu.

Podsumowując, badania przedstawione w dysertacji Pani mgr Mileny Czajki zaplanowano w sposób przemyślany, wyniki przedstawiono w sposób jasny i precyzyjny, a dyskusja jest merytoryczna i oparta na odpowiednio dobranych pozycjach literaturowych, głównie anglojęzycznych z ostatnich kilku lat. Praca przyczynia się do głębszego poznania mechanizmów transdukcji komórek przez wektory oparte o AVV, co stanowi potrzebny wkład w rozwój tego obszaru wiedzy; bowiem pomimo powszechnego wyboru wektorów opartych o AAV w terapii genowej (*in vivo*), mechanizmy dostarczania genu terapeutycznego i interakcje w obrębie komórki nie są poznane.

Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że w pełni spełnia ona wymogi merytoryczne i formalne stawiane dysertacjom doktorskim i określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku i stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz. 882 z późn. Zm.). Niniejszym, zwracam się do Wysokiej Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Mileny Czajki do dalszych etapów postępowania w ubieganiu się o stopień naukowy doktora.

Łączę wyrazy szacunku,



Dr hab. Barbara Bojko, Prof. UMK