

Zakład Farmacji Aptecznej

Wydział Nauk
Farmaceutycznych
w Sosnowcu41-200 Sosnowiec
ul. Kasztanowa 3
www.sum.edu.plKIEROWNIK Zakładu
dr hab. n. farm. Paweł Olczyk, prof. SUM
polczyk@sum.edu.plSEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 269 98 39

farmacja_apteczna@sum.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej p.t.: „ Preparaty siRNA w terapii genowej czerniaka w badaniach in vitro i in vivo”, wykonanej przez Panią magister farmacji Joannę Bogustawską-Duch, pod kierunkiem Promotora, Pana dr hab. n. farm. Macieja Mateckiego.

Czerniak skóry, będący nowotworem złośliwym, w blisko 10 procentach przypadków uwarunkowany genetycznie oraz w około 90 procentach stymulowany działaniem światła słonecznego, promieniowania ultrafioletowego czy też przewlekłym oddziaływaniem czynników o charakterze „drażniącym” – ma swoją genezę, w szczególności w neuroektodermalnych komórkach melanocytarnych. Pomimo, iż czerniak skóry odpowiedzialny jest za około 2 procent przypadków nowotworów skóry, cechuje się on nie tylko istotnym odsetkiem śmiertelności osób chorych, lecz także jedną z największych dynamik wzrostu w zakresie odnotowanych przypadków zachorowań. Omawiany nowotwór – najprawdopodobniej o najwyższym stopniu immunogenności – pojawiający się najczęściej po upływie czwartej/piątej dekady życia, jest schorzeniem uleczanym, np. w odniesieniu stadiów łagodnych, cechujących się m.in. naciekiem nieprzekraczającym 1 mm, średnicą poniżej 5 mm, kształtem owalnym symetrycznym oraz nieobecnością przerzutów do węzłów chłonnych, w przeciwieństwie do czwartego stopnia zaawansowania, w przebiegu którego terapia – do niedawna – cechowała się niezadowalającą efektywnością, wyrażoną wskaźnikiem długoletniej przeżywalności równej około 2-3%. Podejście, łączące zastosowanie preparatu immunoterapeutycznego, tj. ipilimumabu, ukierunkowanego na wzmożenie reakcji immunologicznej w odniesieniu do komórek nowotworowych, oraz preparatu o właściwościach immunomodulujących, takiego jak przeciwciało monoklonalne, wiążące się z receptorem programowanej śmierci komórki 1 (PD-1), tj. niwolumabu, umożliwiło osiągnięcie 36 – miesięcznego okresu pozbawionego progresji, w 48 procentach przypadków. Wdrożenie natomiast do rutynowej diagnostyki czerniaka biopsji płynnej ctDNA, wspartej analizą molekularną NGS, zapewnić może zaobserwowanie „postępu” molekularnego charakteryzującego nowotwór, wyprzedzającego pojawianie się zmian dostrzegalnych przy użyciu technik obrazowych. Wymienione podejście diagnostyczne, wraz z rozwiązaniem terapeutycznym zaproponowanym przez Doktorantkę, przynieść może – już w niedalekiej przyszłości – wymierne korzyści chorym z omawianą dolegliwością nowotworową, stwarzając bazę do rozwoju wysoce pożądanej terapii o charakterze spersonalizowanym.

Zakład Farmacji Aptecznej

Wydział Nauk
Farmaceutycznych
w Sosnowcu41-200 Sosnowiec
ul. Kasztanowa 3
www.sum.edu.plKIEROWNIK Zakładu
dr hab. n. farm. Paweł Olczyk, prof. SUM
polczyk@sum.edu.plSEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 269 98 39

farmacja_apteczna@sum.edu.pl

Tematyka ocenianej rozprawy wpisuje się w zakres badań, prowadzonych od lat – z sukcesem – przez Pana prof. dr hab. n. farm. Macieja Małeckiego – uznanego Eksperta w sferze dokonań badawczych, przyczyniających się do wdrożenia unikalnych rozwiązań terapeutycznych w dziedzinie farmacji praktycznej i biologii molekularnej, co znajduje swój wyraz w licznych publikacjach o zasięgu międzynarodowym. Oceniana dysertacja obejmuje 153 strony tekstu wraz z piśmiennictwem. Manuskrypt podzieliła Autorka na typowe rozdziały, zachowując właściwe pomiędzy nimi proporcje. Praca zawiera 22 tabele i 46 rycin.

Wprowadzeniem do rozprawy jest indeks skrótów, poprzedzający przejrzyste zredagowane Streszczenie, opracowane w polsko – i anglojęzycznej wersji. Rozdział „Wstęp” opracowała Doktorantka w oparciu o starannie dobrane, aktualne dane literaturowe na temat genetycznych uwarunkowań, etiologii czy epidemiologii czerniaka skóry, znaczenia modelu stochastycznego i hierarchicznego w progresji zmian, szczególną uwagę poświęcając metodom diagnostycznym oraz algorytmom terapeutycznym, stosowanym w odniesieniu do omawianego schorzenia. Autorka nie pominęła we „Wstępie” trudnych zagadnień potencjalnych strategii terapii genowej nowotworów, rozwijając przy tym problematykę implementacji terapii genowej w leczeniu czerniaka skóry. Dalszą część rozdziału Autorka poświęciła m.in. zjawisku interferencji RNA, znaczeniu nośników nie wirusowych, podkreślając także znaczenie czynników – sekrecyjnego: VEGF i transkrypcyjnego: SOX10 w terapii celowanej czerniaka skóry. Zawarte w rozdziale „Wstęp” informacje świadczą o wiedzy Autorki jak i Jej przygotowaniu do podjęcia badań, stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

Przejrzyście sformułowany cel dysertacji posiada adekwatne uzasadnienie. Doktorantka postanowiła: - opracować formułację transfekcyjne psiSOX10/nośnik, i psiVEGF/nośnik, postępując się komórkami linii B16-F10; - oszacować wpływ wyciszenia aktywności genów SOX10 i VEGF względem ekspresji wybranych genów, determinujących kancerogenność komórek linii B16-F10, włączając IL6, NRP2, TNF, COL18A1, FLT4, a ponadto: - określić aktywność przeciwnowotworową genowych formułacji psiRNA poprzez analizę oddziaływania preparatów zawierających psiSOX10 oraz psiVEGF, na wzrost i unaczynienie komórek linii B16-F10 u myszy laboratoryjnych szczepu C57BL/6J.

Pragnę podkreślić, iż realizacja części doświadczalnej pracy wymagała dużej wiedzy i praktycznych umiejętności Doktorantki,

Zakład Farmacji Aptecznej

Wydział Nauk
Farmaceutycznych
w Sosnowcu41-200 Sosnowiec
ul. Kasztanowa 3
www.sum.edu.plKIEROWNIK Zakładu
dr hab. n. farm. Paweł Olczyk, prof. SUM
poleczyk@sum.edu.plSEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 269 98 39

farmacja_apteczna@sum.edu.pl

które z pewnością nabyła pracując pod kierunkiem Pana Profesora Macieja Małeckiego, którego osiągnięcia w zakresie tematyki ocenianej rozprawy doktorskiej są powszechnie znane. Szczegółowy opis zastosowanych metod badawczych oraz warunków prowadzenia oznaczeń zamieściła Doktorantka w starannie opracowanym rozdziale „Materiał i metody”.

Wyniki badań zostały wyczerpująco opisane oraz przedstawione w 16 tabelach oraz zaprezentowane graficznie na 43 rycinach, których umieszczenie w teście pracy znacząco ułatwiło lekturę tej części manuskryptu. Treść omawianego rozdziału rozprawy wskazuje, iż cel pracy doktorskiej został w pełni zrealizowany. Doktorantka wykazała m.in., że: - komórki linii B16-F10, w warunkach in vitro, efektywnie transfekują niewirusowe preparaty psiRNA: Lyovec (cechując się wydajnością równą 74-89%) oraz psiRNA: Attractene (cechując się wydajnością równą 83-93%); - wykazała ograniczenie ekspresji genów SOX10 i VEGF, przez zastosowane formułacje psiSOX10 oraz psiVEGF; - zaobserwowała stymulowane działaniem czynnika psiSOX10 wzrost i obniżenie ekspresji odpowiednio genów NRP2, COL18A1, IL6, TNF, FLT4 oraz genu MAGEB16; - powiązała hamowanie wzrostu guza poddanego działaniu preparatów psiSOX10 i psiVEGF z ograniczeniem aktywności angiogennej komórek linii B16-F10.

Interpretację uzyskanych, wartościowych wyników badań zamieściła Doktorantka w rozdziale „Dyskusja”. Przytoczony rozdział dysertacji stanowi jednoznaczne potwierdzenie dużej wiedzy Autorki w zakresie opracowania i oceny innowacyjnych formułacji przeciwnowotworowych, co stanowiło przedmiot Jej badań, jak również – umiejętności krytycznego oceniania uzyskanych rezultatów. Co nie mniej ważne, na podkreślenie zasługuje fakt nielicznych danych literaturowych, które korespondują z podjętą, nowatorską problematyką badawczą, istotnie utrudniając odniesienie własnych wyników/wniosek do dokonań innych autorów.

Zaproponowane przez Autorkę wnioski, będące rzeczową odpowiedzią na cele pracy, w pełni zgodne z uzyskanymi wynikami, stanowią wyraz realizacji zadań badawczych.

Należy jednak zaznaczyć, iż Wnioski nie powinny zawierać powtórzenia wyników badań.

Innowacyjnemu charakterowi dysertacji nie ustępuje również sposób cytowania literatury w teście pracy, najpierw bowiem pojawia

Zakład Farmacji Aptecznej

Wydział Nauk
Farmaceutycznych
w Sosnowcu41-200 Sosnowiec
ul. Kasztanowa 3
www.sum.edu.plKIEROWNIK Zakładu
dr hab. n. farm. Paweł Olczyk, prof. SUM
polczyk@sum.edu.plSEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 269 98 39

farmacja_apteczna@sum.edu.pl

się pozycja nr 82, str. 24, zaś publikacje oznaczone numerami 81 i 80 występują na stronie 27.

Najprawdopodobniej w opinii Doktorantki publikacja: "Buscà R., Berra E., Gaggioli C, Khaled M., Bille K., Marchetti B., Thyss R., Fitsialos G., Larribère L., Bertolotto C., Virolle T., Barbry P., Pouyssegur J., Ponzio G., Ballotti R. Hypoxia-inducible factor $\{\alpha\}$ is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. J Cell Biol. 170(1):49-59, 2005", jest szczególnie istotna, bowiem zastępuje na dwukrotne przytoczenie w spisie piśmiennictwa – nr 198 oraz nr 206.

Kilka zapytań oraz sugestii powstało w przebiegu lektury rozdziału „Materiał i metody”. I tak:

- Proponowałbym postąpić się sformułowaniem: linia komórkowa zamiast „komórki linii” str. 48, wers 1 podrozdziału 3.1.1; myszy szczepu C57BL/6 zamiast „myszy linii C57BL/6” str. 48, wers 2 podrozdziału 3.1.1; Kolejne generacje linii komórek B16 hodowano/modyfikowano zamiast „Kolejne generacje linii komórek B16 tworzono” str. 48, wers 2/3 podrozdziału 3.1.1.
- Odnosząc się do sformułowania – „Wszelkie zabiegi były realizowane przez profesjonalny zespół, z dużym doświadczeniem w pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi” str. 48, wers 4/5 podrozdziału 3.1.3 – specjaliści współtworzący wspomniany zespół powinni legitymować się certyfikatem, potwierdzającym ukończenie szkolenia uprawniającego do realizacji procedur badawczych z udziałem zwierząt.
- Proponowałbym wyodrębnić w podrozdziale „3.2. Odczynniki chemiczne, zestawy odczynników” dwóch części: odczynniki wykorzystywane w hodowli komórkowej oraz odczynniki używane w doświadczeniach z zakresu biologii molekularnej.
- Odnośnie „Medium hodowlanego DMEM + GlutaMAX” Autorka nie opisuje stosunku DMEM/GlutaMAX.
- Autorka nie określa stężeń zastosowanych antybiotyków – AAS (penicylina, streptomycyna, amfoterycyna B).
- Autorka nie wyjaśnia po osiągnięciu jakiej konfluencji podejmowała się pasażowania komórek (podrozdział 3.5 Hodowla komórkowa – Pasażowanie komórek).

Zakład Farmacji Aptecznej

Wydział Nauk
Farmaceutycznych
w Sosnowcu41-200 Sosnowiec
ul. Kasztanowa 3
www.sum.edu.plKIEROWNIK Zakładu
dr hab. n. farm. Paweł Olczyk, prof. SUM
poleczyk@sum.edu.plSEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 269 98 39


farmacja_apteczna@sum.edu.pl

- Odnośnie sformułowania „Przed transfekcją pożywka hodowlana została wymieniona na świeżą, a wytworzone kompleksy zawierały plazmid bądź plazmidy...” – Autorka nie wyjaśnia w jaki sposób potwierdziła, że „kompleksy zawierały plazmid bądź plazmidy?” (podrozdział 3.6 Transfekcja komórek *in vitro*).
- Odnośnie sformułowania „energicznie wytrząsano przez 15 sekund” (podrozdział 3.7 Izolacja RNA) – zaleca się worteksowanie.
- Autorka nie uzasadnia wyboru częstotliwości oraz okresu ostrzykiwań „Zwierzęta ostrzykiwano co 3 dni przez okres 15 dni” (podrozdział 3.11 Eksperymenty na zwierzętach, str. 60).
- Autorka postępuje się potocznym sformułowaniem „poziom hemoglobiny” – proponowałbym użyć terminu: stężenie.

Przytoczone uwagi o charakterze polemicznym, typowo metodycznym, nie wpływają, w najmniejszym stopniu, na moją wysoce pozytywną ocenę dokonań Doktorantki. Praca Pani mgr farmacji Joanny Bogusławskiej-Duch, nosząca tytuł: „*Preparaty siRNA w terapii genowej czerniaka w badaniach in vitro i in vivo*”, w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Wnosi nowe informacje do wiedzy na temat możliwości zastosowania formuacji opartych na plazmidowych wektorach psiRNA wyciszających geny SOX10 i VEGF w leczeniu czerniaka skóry, którego terapia – pomimo stale dokującego się postępu w farmakologii onkologicznej – nie przynosi zadowalających rezultatów. Oceniana dysertacja stanowi ponadto potwierdzenie umiejętności praktycznych m.in. z zakresu implementacji nowoczesnych technik biologii molekularnej. Z pełnym zatem przekonaniem przedkładam Panu Dziekanowi Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, wniosek o dopuszczenie Pani mgr farmacji Joanny Bogusławskiej-Duch do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zważywszy innowacyjność i zaawansowanie problematyki badawczej, merytoryczny poziom i aplikacyjny charakter dysertacji, proponuję wyróżnienie pracy.

Z wyrazami szacunku,


dr hab. n. farm. Paweł Olczyk