

Prof. dr hab. n. farm. Justyn Ochocki
Kierownik Katedry Chemii Medycznej
i Zakładu Chemii Bionieorganicznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Muszyńskiego, 90-151 Łódź
tel. 42 677 92 20
e-mail: justyn.ochocki@umed.lodz.pl

Łódź, 15 maja 2021

Recenzja pracy doktorskiej mgr Magdaleny Ducher-Hanaka

*pt. „Ocena ekspresji genów warunkujących aktywność transdukcyjną
wektorów rAAV”*,

Rozprawa doktorska dotyczy terapii genowej nowotworów i wektorologii rekombinowanych wirusów związanych z adenowirusami (rAAV). Jest kontynuacją badań prowadzonych w Zespole prof. dr hab. n. farm. Macieja Małeckiego, Kierownika Zakładu Farmacji Stosowanej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Założeniem Dysertacji jest ocena podatności nowotworów o różnych lokalizacjach narządowych na transdukcję rAAV w kontekście projektowania przyszłych protokołów terapii genowej. W swojej pracy Pani mgr Magdalena Ducher-Hanaka oceniła ekspresję trzech genów (*HSPG1*, *HSPG2*, *AAVR*), kodujących kluczowe białka receptorowe w dokomórkowej transmisji rAAV. Doktorantka wykonała badania metodą qPCR, wykorzystując sondy molekularne TaqMan. Dokonała analizy porównawczej w zakresie wrażliwości tkanek nowotworowych i linii komórkowych na proces transdukcji wektorami rAAV.

Zadania badawcze w ramach dysertacji był następujące:

1. Ocena ekspresji genów *HSPG1*, *HSPG2* i *AAVR* w nowotworach o różnej lokalizacji (głowy i szyi, krtani, ślinianki, jamy brzusznej, jelita grubego, wątroby, sutka, jajnika, trzonu macicy).
2. Ocena ekspresji genów *HSPG1*, *HSPG2* i *AAVR* w komórkach ustalonych linii komórkowych (jelita grubego, czerniaka ludzkiego, jajnika).
3. Analiza porównawcza ekspresji genów *HSPG1*, *HSPG2* i *AAVR* w materiale klinicznym i nieklinicznym oraz selekcja nowotworów podatnych na transdukcję rAAV.

Doktorantka badała ekspresję genów *HSPG1*, *HSPG2* i *AAVR* (kluczowych genów transmisji rAAV) w nowotworach o różnej lokalizacji. Autorka Rozprawy wykonała badania eksperymentalne w oparciu o materiał kliniczny (wycinki nowotworowe), który pochodził od pacjentów onkologicznych (nowotwory głowy i szyi, krtani, ślinianki, jamy brzusznej, jelita grubego, wątroby, sutka, jajnika, trzonu macicy) operowanych w warszawskich klinikach. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej KB/62/2017 WUM z dnia 11.04.2017 r.

Oprócz materiału klinicznego Doktorantka poddała analizie 8 linii komórkowych: raka jelita grubego (gruczolakorak jelita grubego, rak kątnicy, rak okrężnicy), 4 linii komórkowych czerniaka i 2 linii komórkowych raka jajnika. Materiał niekliniczny pochodził z hodowli komórek nowotworowych ustalonych linii *in vitro*, prowadzonych w Zakładzie Farmacji Stosowanej WUM.

W dysertacji Doktorantka przeanalizowała 3 geny związane z aktywnością transdukcijną wektorów rAAV (*HSPG1*, *HSPG2*, *AAVR*). Jako kontrolę endogenną użyto *ACTB*. Badania przeprowadzono na 148 próbkach (134 tkanki nowotworowe i 14 linii komórkowych). Do dalszych analiz użyto 144 izolaty (130 tkanek nowotworowych i 14 linii komórkowych). W badanej grupie byli chorzy z rozpoznaniem raka jajnika (11 chorych-

8,5%), raka piersi (16 chorych- 12,3%), raka trzonu macicy (9 chorych- 6,9%), nowotworów głowy i szyi (15 chorych- 11,5%), nowotworów jamy brzusznej (6 chorych- 4,6%), raka jelita grubego (26 chorych- 20%), raka krtani (33 chorych- 25,4%), raka ślinianki (8 chorych- 6%) i raka wątroby (6 chorych- 4,6%).

W pracy nie znalazłem dokładnego rozpoznania Pacjentów. Poproszę Panią Doktorantkę o wyjaśnienie.

Autorka rozprawy w swoich badaniach: przeprowadziła izolację RNA z zamrożonych tkanek i linii komórkowych i zastosowała metodę spektrofotometryczną i technikę elektroforezy mikro kapilarnej do oceny stężenia, czystości oraz jakości otrzymanego RNA, Dokonała usunięcia zanieczyszczającego DNA z izolatów i przeprowadziła reakcję odwrotnej transkrypcji (*Reverse Trascription- RT*) polegającą na przepisaniu całkowitego RNA na jednoniciowe cDNA. Dokonała oceny ekspresji genów HSPG1, HSPG2, AAVR przy zastosowaniu metody (real-time PCR), która umożliwia monitorowanie przyrostu produktu reakcji w każdym cyklu amplifikacji poprzez zastosowanie techniki znakowania fluorescencyjnego.

Należy w tym miejscu sformułować pytanie dlaczego Doktorantka nie wykonała analizy jakości RNA metodą elektroforezy kapilarnej dla wszystkich prób? Jakie były kryteria wyboru kilku prób, które mają oznaczone wskaźniki RIN (RNA Integrity Number).

Doktorantka przeprowadziła analizę statystyczną przy użyciu pakietu IBM SPSS Statistics 25 aby sprawdzić czy istnieją istotne statystyczne różnice pomiędzy więcej niż dwoma niezależnymi grupami. Analiza korelacji Spearmana pozwoliła Doktorantce przeanalizować czy występuje istotny statystycznie związek pomiędzy badanymi zmiennymi. Za poziom istotny statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$.

Ważne było ustalenie czy poznanie wzorców ekspresji genów w nowotworach może być pomocne w opracowywaniu protokołów terapii genowej w kierunku personalizacji

leczenia i czy sygnatury genowe mogą być użyteczne w diagnostyce nowotworów w kierunku selekcji chorych czy wczesnego wykrywania nowotworów.

Badania dowiodły, że badane tkanki wykazują różną ekspresję genów- kandydatów transdukcji rAAV. Najbardziej potencjalnie podatny na transdukcję rAAV był układ pokarmowy, w tym najbardziej wrażliwy były nowotwór wątroby. Nnajmniej wrażliwą na transdukcję wektorami rAAV grupą biologiczną były nowotwory głowy i szyi oraz krtani.

Wyniki mogą stać się użyteczne w opracowywaniu sygnatur genowych w planowaniu prób, jak również protokołów terapii genowej. Ocena wybranych genów może być składową różnicowej diagnostyki molekularnej chorych na nowotwory. Może pozwolić na podjęcie decyzji o doborze pacjentów pod względem wrażliwości na nowoczesne metody terapii- genoterapii z użyciem bezpiecznych rekombinowanych wektorów rAAV.

Praca doktorska pt. „Ocena ekspresji genów warunkujących aktywność transdukcijną wektorów rAAV”, wykonana została w ramach realizacji grantu badawczego Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (STRATEGMED1/233264/4/NCBR/2014). Kierownikiem Projektu jest prof. dr hab. n. farm. Maciej Małecki.

Wstęp pracy jest napisany w sposób precyzyjny i logiczny, a cel podjętych badań dobrze uzasadniony. Rozprawa jest przygotowana starannie pod względem edytorskim. Zawarty w niej został szeroki i kompetentny przegląd aktualnej literatury naukowej.

Pani mgr Magdalena Ducher-Hanaka zaobserwowała zależność pomiędzy poziomem genów *HSPG1* i *HSPG2* w nowotworach krtani, a także między poziomem genów *HSPG1* i *AAVR* w liniach komórkowych raka jelita grubego. Wysokiej wartości poziomu genu *HSPG1* towarzyszy wysoka wartość poziomu genu *HSPG2* w nowotworach krtani oraz wysokiej wartości poziomu genu *HSPG1* towarzyszy wysoka wartość poziomu genu *AAVR* w liniach komórkowych raka jelita grubego.

Autorka rozprawy stwierdza, że sygnatura genów badanych może być pomocna w planowaniu i opracowywaniu skutecznych prób terapii genowej rAAV nowotworów (układ pokarmowy).

Jakie są relacje uzyskanych przez Doktorantkę wyników (transkryptów) w stosunku do oceny białek?

Wyniki pracy dają dobrą podstawę dla dalszych badań w opracowywaniu sygnatur genowych, które mogą być użyteczne w planowaniu prób, jak również protokołów terapii genowej. Mogą przyczynić się dla rozwoju diagnostyki i terapii onkologicznej.

Czy wyniki badań zostały opublikowane?

Wniosek końcowy.

Stwierdzam, że rozprawa pt. „Ocena ekspresji genów warunkujących aktywność transdukcyjną wektorów rAAV”, spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i składam wniosek do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Ducher-Hanaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ducher-Hanaka'.