

**Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o
zdrowiu w dyscyplinie nauk farmaceutycznych**

pod tytułem:

"Hydrożelowe formacje rAAV w terapii genowej nowotworów mózgu"

autorstwa:

mgr farm. Żanety Słyk

z Wydziału Farmaceutycznego,

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie

Promotor:

Prof. dr hab. n. farm. Maciej Małecki

Praca została zrealizowana w Zakładzie Farmacji Stosowanej w ramach realizacji grantu badawczego NCBiR, Strategmed 1/233264/4/NCBR/2014 MentorEYE.

Pierwotne nowotwory mózgowia stanowią jedynie 2% wszystkich nowotworów człowieka będąc jednocześnie przyczyną aż 10% zgonów z przyczyn nowotworowych. Stała objętość jam czaszki oraz bariera krew-mózg powodują, że nowotwory ośrodkowego układu nerwowego stanowią odmienny w swojej biologii problem terapeutyczny. Klasyfikacja neuropatologiczna nowotworów ośrodkowego układu nerwowego, opracowana w latach czterdziestych ubiegłego wieku przez Jamesa Watsona Kernohana w swoich podstawowych założeniach jest aktualna do dzisiaj. Wprowadzona w 2021 roku nowa klasyfikacja WHO nowotworów układu nerwowego wprowadza szereg zmian kładąc szczególny nacisk na badania molekularne i genetyczne, których celem jest bardziej precyzyjna kodyfikacja tych patologii. Wśród nowotworów pierwotnych najczęściej stwierdzane są złośliwe guzy pochodzenia glejowego. Guzy przerzutowe występują dwukrotnie częściej niż guzy pierwotne mózgowia. Autorka w przedstawionej dysertacji analizuje wyniki swoich badań, które potencjalnie będą mogły być wykorzystane w terapii nowotworów pierwotnych i wtórnych ośrodkowego układu nerwowego.

Recenzowana rozprawa doktorska podejmuje niezmiernie ważny oraz do dziś nierozwiązany problem skutecznego leczenia nowotworów ośrodkowego układu nerwowego oraz potencjalnego zastosowania wektorów genowych i hydrożeli w terapii tych patologii. Praca ma układ typowy dla dysertacji doktorskiej i posiada wymagane elementy strukturalne. Praca liczy 162 strony, obejmuje 11 rozdziałów, ze streszczeniem w języku polskim i angielskim, wykazem rycin i tabel oraz wykazem używanych skrótów. Piśmiennictwo obejmuje 320 pozycji, które w większości zostały opublikowane w ostatnich latach i są wymieniane zgodnie z chronologią cytowania. Praca została zrealizowana w ramach grantu *Strategmed 1/233264/4/NCBR/2014 MentorEYE* a zgoda Komisji Bioetycznej nie była wymagana do realizacji badania.

Doktorat został napisany bardzo obszernie, dobrą polszczyzną. W pracy pojawiły się nieliczne błędy edytorskie związane z nieodpowiednią tabulacją i nieadekwatnym przeniesieniem przerwy pomiędzy znakami interpunkcyjnymi a tekstem.

Praca rozpoczyna się wykazem skrótów, których wysoka liczba (ponad sto) może utrudniać lekturę. Prawdopodobnie dla zwiększenia atrakcyjności literackiej monografii

Doktorantka niechronologicznie używa skrótów lub ich rozwinięć. Przypisy do rycin znajdują się poniżej grafik, natomiast do tabel powyżej grafik, co początkowo może mylić.

We wstępie, Autorka dość przystępnie omawia historię i założenia terapii genowej. Kolejno autorka bardzo szczegółowo przedstawia podstawy molekularne i strategie terapeutyczne definiując model metody *in vivo* i *ex vivo*. Podobnie szczegółowo i dość przystępnie Doktorantka wprowadza założenia wektorologii genowej, informacje dotyczące rekombinowanych wektorów wirusowych AAV oraz informacje dotyczące recepturowych formulacji genowych. Kolejno Autorka przedstawia założenia powstałych postaci leków w tym hydrożeli oraz opatrunków żelowych. Następnie Doktorantka przedstawia ogólne założenia budowy i fizjologii ośrodkowego układu nerwowego oraz przedstawia założenia terapii genowej w leczeniu patologii ośrodkowego układu nerwowego. W następnym podrozdziale Wstępu Autorka ponownie, jednak bardziej szczegółowo przedstawia budowę oraz aktywność metaboliczną bariery krew mózg oraz bariery krew-mózg-guz. Przeprowadzona przez Autorkę analiza jest w pewnych fragmentach nad wyraz szczegółowa i nie zawsze związana z tematem dysertacji (np. informacje o terapii choroby Parkinsona). W kolejnym podrozdziale Wstępu Autorka kontynuuje polemikę nad problemami związanymi z terapią patologii ośrodkowego układu nerwowego w tym chorób neurodegeneracyjnych. Wydaje się, że podejmowana w tym podrozdziale tematyka, podobnie nie jest bezpośrednio związana z tematem dysertacji a potencjalnie prowadzona polemika powinna odbyć się w rozdziale Dyskusja. W kolejnym podrozdziale z pewną swadą Autorka przedstawia założenia neuroonkologii. Doktorantka przedstawia klasyfikacje WHO z 2016 roku jako aktualną, gdyż nowa klasyfikacja z 2021 roku w chwili opracowania manuskryptu nie była jeszcze dostępna. W następnym podrozdziale Doktorantka ogólnie przedstawia problematykę związaną z diagnostyką i leczeniem glejaków mózgu. Uważam, że należy unikać sformowań sugerujących możliwość przeprowadzenia o radykalnej resekcji glejaków złośliwych mózgowia. Należy zwrócić uwagę, że terapia LITT dla nowotworów mózgowia wciąż nie jest alternatywą dla leczenia chirurgicznego i/lub radioterapii (metoda ta nie jest dostępna w Polsce i zgodnie z moją wiedzą nie posiada znaku CE). Podobnie nie jest jasne czym jest terapia polem elektrycznym proponowana przez

NCCN. W ostatnich latach coraz rzadziej stosuje się WBRT a podane przez Autorkę dawki całkowite leczenia radiacyjnego pierwotnych, złośliwych guzów mózgu należy traktować jako maksymalne.

Autorka wielokrotnie używa określenia parenchyma oraz tkanka nerwowa w odniesieniu do mózgowia, co nie jest powszechnie stosowane. Uzasadnione wydaje się być unikanie sformowań "komórki mózgu" czy też "prawidłowe komórki mózgu" precyzując czy informacje dotyczą komórek glejowych czy też nerwowych. Podobnie korzystniej byłoby stosować sformowanie nowotwór mózgu zamiast guz mózgu. Do rozważenia byłoby wyeliminowanie neologizmów (np. "metastaza", "progresywność" czy "intratność chemioterapii"). Podobnie sformowanie dotyczące "wysokiego stopnia śmiertelności" nie są powszechnie stosowane. Przez słowo "compliance" należy natomiast rozumieć realizację zaleceń lekarskich przez pacjenta. Należy podkreślić, że Wstęp jest przedstawiony w sposób zgodny z obecną wiedzą. W sposób prawidłowy przedstawiono powszechnie przyjęte algorytmy terapeutyczne.

W drugim rozdziale manuskryptu, Autorka przedstawia cele pracy. Należałoby w podpunkcie b, punktu 1 określić jakich komórek mózgowych analiza transdukcji będzie podejmowana. Cele pracy przedstawione są jednak w sposób przejrzysty.

W rozdziale Materiał, Autorka szczegółowo wymienia nazwy wykorzystanych materiałów bez podania jednak ich liczby lub objętości (z uwagi na fakt, że praca była finansowana ze środków grantowych dane te powinny być dostępne). Pewne informacje dotyczące liczby preparatów znajdują się w kolejnych rozdziałach: np. w podrozdziale 4.3 rozdziału Metody: Autorka podaje, że pobrano mózgi od 4 zdrowych samców.

W rozdziale Metody, Doktorantka szczegółowo przedstawia elementy i etapy prowadzonego badania. Zakres przeprowadzonych przez Doktorantkę prac jest ogromny i imponujący. Nie jest jasne dlaczego tytuły podrozdziałów 4.1 i 4.1.3 są takie same. Nie jest jasne w jaki sposób Autorka analizowała śmiertelność mózgowi myszy w warunkach *ex vivo*? W rozdziale Metody w wielu podpunktach (np. 4.1, 4.3, 5, 5.1, 10.1), Autorka ocenia i analizuje badane parametry, co powinno zostać przeprowadzone dopiero w rozdziale Wyniki lub Dyskusja. Natomiast w pierwszych

zdaniach Wyników Autorka przedstawia ponownie metodologię badania. Mając świadomość wskazanych, drobnych nieprawidłowości w chronologii monografii, Autorka powołuje się w Wynikach na tabele umieszczoną w rozdziale Materiały i Metody (tab. 6). Podane przez Doktorantkę informacje są bardzo szczegółowo omawiane. Wydaje się, że Autorka w punkcie 3 Wyników analizowała śmiertelność "komórek mózgu" (neuronów, gleju), nie mózgów.

Podczas prowadzenia analizy statystycznej Autorka korzystała z oprogramowania GraphPad Prism 9. Analizę wariacji dokonano metodą jednoczynnikową (ANOVA). Do oceny normalności wykorzystano test Shapiro-Wilka. Istotność statystyczną różnic oceniano przy pomocy testu post-hoc, testu Dunett'a lub testu Bonfferoni. Wykazano poziom istotności * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. W rozdziale Wyniki Autorka szczegółowo przedstawia uzyskane dane wykorzystując dla ich ilustracji tabele i wykresy.

W rozdziale Dyskusja Autorka omawia wyniki swoich badań odnosząc się trafnie do wcześniej publikowanych danych. Ta część monografii jest również bardzo obszernie i szczegółowo przygotowana, jednak część informacji mogłaby zostać uwzględniona we Wstępie dysertacji. Prawdopodobnie chcąc przedstawić analizowany problem jak najszerszej, Autorka powołuje się na szereg badań niezwiązanych z tematem pracy odwołując się między innymi do strony *clinicaltrials.gov* co wydaje się być zbyt ogólne. Ostatni akapit Dyskusji jest raczej formą wniosku przeprowadzonego badania niż elementem polemiki.

Podane przez Autorkę wnioski odpowiadają celom pracy. Niezgodna liczba wniosków z liczbą celów pracy wynika z faktu, że Autorka podzieliła odpowiedź na pytania badawcze zawarte w punkcie 3, rozdziału Cele Pracy na trzy podpunkty rozdziału Wyniki. Rozdział ten jest przedstawiony w sposób zwięzły i adekwatny.

Streszczenia w języku polskim i angielskim są napisane poprawnie i odpowiadają treści pracy. Brakuje jednak w streszczeniach wyszczególnienia typowych elementów dysertacji jak: Cele, Materiał, Metody i Wyniki. W streszczeniu w języku angielskim, prawdopodobnie w wyniku błędu technicznego pojawił się skrót "OUN".

Praca stanowi potencjalnie istotny krok na drodze do wprowadzenia terapii genowej nowotworów mózgu. Rozprawa odpowiada warunkom określonym w art. 13. ust. 1. Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2017 roku poz. 1789) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stanowiąc oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną w dyscyplinie oraz posiada umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Ponadto Autorka udowodniła, że umie samodzielnie dokonać oceny i analizy zebranego przez siebie materiału. Doktorantka w sposób prawidłowy przeanalizowała i zacytowała należne materiały źródłowe i publikacje w pełni realizując postawione sobie cele, dlatego stawiam wniosek i proszę Wysoką Radę Dyscyplin Farmaceutycznych o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr farm. Żanetę Słyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Załączając wyrazy szacunku,



Tomasz Mandat

Warszawa, 3 listopada 2021 roku