



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

Wydział Farmaceutyczny

Zakład Chemii Leków

15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2D

Tel. (85) 748-57-06, FAX (85) 748-58-66

pal@umb.edu.pl

Prof. dr hab. n. farm. Jerzy Pałka

Białystok, 31.05.2022.

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

PT.: "Rekombinowane wektory AAV w termowrażliwej transdukcji komórek nowotworowych" wykonanej przez mgr Alicję Bieńkowską-Tokarczyk w Zakładzie Farmacji Stosowanej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Treść niniejszej pracy doktorskiej stanowi kontynuację problematyki naukowo-badawczej Zakładu Farmacji Stosowanej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego dotyczącej wykorzystania rekombinowanych wirusów związanych z adenowirusami (rAAV) w terapii genowej chorób nowotworowych. Przedmiotem badań stanowiących treść niniejszej pracy doktorskiej jest ocena wpływu hipertermii na wydajność transdukcji komórek raka jajnika i raka jelita grubego wektorem mozaikowym rAAV/DJ. Wektor ten stanowi jedno z największych osiągnięć inżynierii genetycznej w terapii genowej z uwagi na szeroki tropizm tkankowy, względnie dobrą wydajność transdukcji i stabilność chemiczną i termiczną. Niemniej jednak skuteczność terapii genowej uzależniona jest w głównej mierze od wydajności transdukcji, co stanowi aktualnie przedmiot intensywnych badań. Niniejsza praca podejmuje to wyzwanie i przedstawia wyniki badań nad wpływem hipertermii na wydajność transdukcji wektorem AAV/DJ. Badania te wpisują się w nurt innowacyjnej tematyki badawczej Zakładu Farmacji Stosowanej WUM, upatrującej w terapii genowej narzędzie skutecznej walki z rakiem. Doskonalenie wydajności transdukcji z wykorzystaniem wektora AAV/DJ, stanowiące przedmiot badań Doktorantki jest szczególnie pożądane w terapii genowej raka jajnika i raka jelita grubego. Z tego względu uważam, że podjęty temat badawczy jest ważny zarówno z punktu widzenia poznawczego, metodologicznego jak i aplikacyjnego.

Rozprawę doktorską mgr Alicji Bieńkowskiej-Tokarczyk stanowi cykl 4 monotematycznych publikacji (1 pogładowa i 3 doświadczalne) o łącznym współczynniku oddziaływania $IF=9,295$; 210 punktów MEIN. Stanowią one efekt realizacji grantu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu „Strategmed”. Publikacje te dokumentują obszerny zakres badań nad oceną wpływu hipertermii na wydajność transdukcji wektorem AAV/DJ omawianych nowotworowych linii komórkowych i komórek prawidłowych, a także analizą ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w proces transdukcji i białka szoku termicznego. Obszerny zakres badań poświęcono ocenie stabilności omawianego wektora. Funkcjonalne znaczenie tych badań dla terapii genowej opisano w pracy pogładowej. Doktorantka wykorzystwała doświadczenie



zespołu badawczego Zakładu Farmacji Stosowanej WUM oraz wielu innych badaczy z zakresu biologii molekularnej, biologii raka i terapii genowej. Świadczy o tym aktualna i poprawnie dobrana literatura dotycząca tych zagadnień, zamieszczona w cyklu publikacji oraz piśmiennictwie rozprawy doktorskiej.

Jednym z wyzwań niniejszych badań było poszukiwanie charakterystycznych sygnatur transfekowanych komórek poddanych hipertermii poprzez ocenę ekspresji genów kodujących receptor AAV, charakterystyczne proteoglikany siarczanu heparanu (HSPG1/2) i białka szoku termicznego HSP oraz w niektórych przypadkach miRNA. Szczególnie interesujące są wyniki badań nad dwoma liniami komórkowymi raka jajnika, różniącymi się intensywnością proliferacji, różnicowaniem, inwazyjnością, adhezją do lamininy i ekspresją wielu genów, w tym markera nowotworowego CA125. Jakkolwiek wzrost temperatury zwiększał wydajność transdukcji we wszystkich badanych liniach komórkowych to jednak proces ten przebiegał najwydajniej w komórkach o najwyższej inwazyjności (linia OVCAR-3). Potwierdziła to analiza korelacji wzrostu liczby kopii rAAV z liczbą komórek z ekspresją białka zielonej fluorescencji, a także testy adhezji i inwazyjności. Ponadto, w komórkach OVCAR-3 stwierdzono charakterystyczną sygnaturę wysokiej ekspresji większości badanych białek szoku termicznego. Podobne badania przeprowadzono na kilku liniach nowotworowych raka jelita grubego i fibroblastach pochodzących z tego narządu. Wykazały one charakterystyczną sygnaturę ekspresji AAVR, HSPG2 i niektórych białek szoku termicznego korelującą ze zdecydowanym wzrostem transfekcji rAAV/DJ w komórkach poddanych hipertermii. Niniejsze badania przedstawiają dowody, że hipertermia nasila transfekcję wektorem rAAV/DJ i indukuje odpowiedź komórkową w postaci charakterystycznych sygnatur ekspresji genów AAVR i HSP. Pozwala to sądzić, że hipertermia może stanowić skuteczną metodę poprawy wydajności transdukcji komórek raka jajnika i raka jelita grubego. Niezwykle sensne są również badania nad oceną wpływu różnych czynników fizykochemicznych (temperatura, promieniowanie UV) na stabilność rAAV/DJ, które pozwoliły opracować wymagania dotyczące warunków przechowywania tego wektora. Funkcjonalne znaczenie tych badań dla postępu terapii genowej Doktorantka przedstawiła w pracy poglądowej, w której scharakteryzowała receptorowe formułacje genowe na podstawie doświadczeń własnych zespołu naukowego Zakładu Farmacji Stosowanej WUM jak i źródeł farmakopealnych.

Na uwagę zasługuje opanowanie przez Doktorantkę nowoczesnego warsztatu badawczego, zwłaszcza technik biologii molekularnej, biologii komórki, biochemii i biologii raka. Uwagę zwraca profesjonalna dokumentacja wyników badań, które zostały opublikowane w renomowanych, specjalistycznych czasopismach naukowych.

Na podstawie wyników obszernych badań Doktorantka sformułowała 4 wnioski. Odzwierciedlają one najistotniejsze elementy poznawcze pracy.

Dyskusja zawiera konkluzje przedstawione w części doświadczalnej oraz interpretuje uzyskane wyniki badań na podstawie aktualnej literatury przedmiotu. Pozwala to bardzo pozytywnie ocenić specjalistyczną wiedzę Doktorantki, umiejętność rozwiązywania problemów badawczych, korzystania z literatury stanowiącej przedmiot pracy oraz interpretacji wyników.

Niemniej jednak niektóre zagadnienia zamieszczone w rozprawie doktorskiej mogą stanowić przedmiot dalszej dyskusji, na przykład:



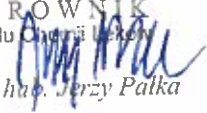
1. Dlaczego komórki raka jajnika poddawano hipertermii przez 3 godziny, a komórki raka jelita grubego tylko godzinę?
2. Analiza przedstawionych wyników badań pozwala sądzić, że hipertermia indukuje inwazyjność komórek nowotworowych poprzez obniżenie adhezji komórek do białek pozakomórkowych (w omawianym przypadku do lamininy). Hipertermia indukuje również niektóre miRNA i HSP upośledzając adhezyjność komórek nowotworowych i nasilając ich inwazyjność. Czy zatem hipertermia nie stwarza ryzyka nasilenia progresji i inwazyjności komórek nowotworowych?
3. Czy z powyższych względów nie należałoby więcej miejsca poświęcić w dyskusji omawianych prac zagadnieniom zarządzania ryzykiem w terapii genowej?
4. Jak wytłumaczyć mechanizm wzrostu wydajności transdukcji wektorem rAAV/DJ w warunkach hipertermii?

Powyższe pytania nie mają oczywiście charakteru uwag krytycznych, mogą natomiast stanowić inspirację do dyskusji nad funkcjonalnym znaczeniem hipertermii w terapii genowej raka.

Reasumując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Alicji Bieńkowskiej-Tokarczyk, stanowiąca cykl 4 publikacji jest pracą wartościową, poprawnie przygotowaną warsztatowo i wnosi nowe elementy poznawcze do wiedzy o wpływie hipertermii na wydajność transdukcji komórek raka jajnika i raka jelita grubego wektorem mozaikowym rAAV/DJ. Wyniki tych badań mają potencjał aplikacyjny w terapii genowej raka.

Oświadczam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z 14 marca 2003, o stopniach naukowych i tytule naukowym i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) i na tej podstawie składam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Alicji Bieńkowskiej-Tokarczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

31. 05. 2022.

K I E R O W N I K
Zakładu Chemii Leków

prof. dr hab. Jerzy Pałka

