



**WOJSKOWY INSTYTUT HIGIENY I EPIDEMIOLOGII**  
**im. gen. Karola Kaczkowskiego**  
01-163 Warszawa, ul. Kozielska 4  
tel. 261 853 101 fax 261 853 133  
e-mail: [kancelaria.jawna@wihe.pl](mailto:kancelaria.jawna@wihe.pl)

dr hab. n. med. Małgorzata Krzyżowska, prof. WIHiE  
Kierownik Zakładu Medycyny Regeneracyjnej  
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii  
w Warszawie

Warszawa, 30.06.2022

### **OCENA**

**rozprawy doktorskiej mgr farm. Alicji Bienkowskiej-Tokarczyk**

**pt.: „Rekombinowane wektory AAV w termowrażliwej transdukcji komórek nowotworowych”**

Praca wykonana w Zakładzie Farmacji Stosowanej Wydziału Farmacji Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Promotor: prof. dr hab. n. farm. Maciej Małecki

Terapia genowa opiera się na możliwości modyfikacji genomu (w domyśle człowieka) i ma na celu zahamowanie ekspresji genu powiązanego z chorobą, bądź jego zamianę czy modyfikację, a w niektórych przypadkach przywrócenie jego prawidłowej sekwencji, umożliwiającej normalną aktywność. Terapia genowa stanowi w zasadzie jedyną drogę terapeutyczną w chorobach uznawanych za nieuleczalne lub pozbawione skutecznych metod leczenia. Zważywszy na rozwój technik biologii molekularnej oraz wiedzy o genomie, coraz bardziej możliwe staje się stosowanie tej metody leczenia w praktyce klinicznej i coraz istotniejsze staje się jej praktyczne doskonalenie.

Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera na 126 stronach wszystkie wymagane rozdziały. We wstępie Doktorantka opisuje szczegółowo na 9 stronach założenia terapii genowej, wykorzystanie wirusów związanych z adenowirusami w badaniach klinicznych obejmujących terapię chorób jednogennych, oraz możliwości stosowania hipertermii celem poprawy skuteczności leczenia chorób nowotworowych. Następnie, Autorka opisuje rolę białek

szoku cieplnego (HSP) w procesach fizjologicznych na terenie komórki, jak również ich rolę w stanach patologicznych, takich jak karcynogeneza, infekcje wirusowe, stany zapalne czy neurodegeneracja. Wstęp zakończono opisem istniejących danych literaturowych na temat korzystnego wpływu hipertermii na skuteczność terapii genowej. Autorka we wstępie nawiązuje do roli białek HSP. Na stronie 16 Wstępu Autorska stwierdza, cytując: „Wyróżnia się małe HSP (w tym HSP27), HSP40, HSP70, HSP90 i duże HSP (np. HSP110)”. Jest to w mojej opinii nieścisłość, gdyż od dosyć dawna wśród HSP wyróżnia się białka wielkocząsteczkowe (75-110 kDa), np. HSP100 i HSP90, średnicząsteczkowe (40-78 kDa) - HSP70, HSP60 i HSP40 oraz małowcząsteczkowe, małe – sHSP (8,5-40 kDa).

W mojej opinii wstęp do rozprawy stanowi dobre, choć nieco za mało obszerne wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej. W dużym stopniu to powtórzenie publikacji przeglądowej nr 1. Zważywszy na rozwój wielu technik modyfikacji genomu (np. CRISP/Casp9), oraz kwestie stabilności czy bezpieczeństwa terapii genowej, warto przedyskutować dlaczego wektory związane z adenowirusem (AAV) zostały wybrane do badań i uznane za najbardziej obiecujące modele badawcze (np. bezpieczeństwo ich stosowania, łatwość produkcji itp.).

W swojej rozprawie doktorskiej Doktorantka postawiła sobie cel badawczy polegający na ocenie wydajności wektorem rAAV/J w warunkach hipertermii komórek raka jajnika (Caov-3), raka jelita grubego (RKO, HT-29 i LS411N) oraz komórek prawidłowych: AAV-293 i CCD-18Co. Ponadto, Doktorantka podjęła się również próby identyfikacji profilu ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w transmisję rAAV i białek szoku termicznego w odpowiedzi na hipertermię. Dodatkowo, Doktorantka oceniła stabilność wektora rAAV/DJ w różnych warunkach fizykochemicznych oraz dokonała charakterystyki recepturowej stosowanych formułacji genowych w terapii genowej.

W rozdziale Materiały i metody Doktorantka przedstawiła szczegółową listę technik oraz odczynników stosowanych przez nią w pracach badawczych (m.in. linie komórkowe, technikę transdukcji, badanie stabilności, testy komórkowe, ocenę wydajności transdukcji). Należy przypuszczać, że istniała przesłanka doświadczalna (żywołność komórek, gęstość hodowli), która wiązała się z wykorzystaniem komórek do doświadczeń w 6 dniu po transdukcji, a nie np. w 5, chociaż w pracy zabrakło takiego uzasadnienia. Podobnie, w pracy zabrakło opisu doświadczenia służącego sprawdzeniu żywołności transdukowanych komórek w warunkach hipertermii metodą cytometrii przepływowej. Nie wiadomo, w jakich ramach czasowych te doświadczenia były przeprowadzane, co utrudnia zrozumienie przedstawionych

w Publikacji 3 cytogramów. Ponadto, barwienie 7-AAD, w zależności od warunków, pozwala na wykrywanie zarówno wczesnej śmierci komórek (apoptozy), jak i komórek martwych (nekrotycznych). Zastanawia wybór takiego akurat rodzaju barwienia, pomimo dostępności na rynku znaczników o podobnym spektrum emisji fluorescencji, które można stosować do pomiarów metodą cytometrii przepływowej.

- Uwaga metodyczna, związana z badaniem wpływu UV na stabilność wektora – promieniowanie ultrafioletowe stosowane w komorach do pracy jałowej z hodowlami to promieniowanie UV-C, o długości 100-280 nm. Taka długość promieniowania ma działanie bójcze, niszczące DNA. W metodyce zabrakło podania dokładnych warunków – odległości, czy zastosowano chłodzenie (lampa emituje ciepło, itp.).

Wyniki badań Doktorantka przedstawiła w formie 3 publikacji oryginalnych oraz jednej publikacji przeglądowej, poprzedzonych opisem treści publikacji. Ważną częścią rozprawy doktorskiej jest przeprowadzona na 8 stronach Dyskusja, w której omówione zostały uzyskane wyniki w oparciu o 134 pozycje literaturowe, jedną rycinę oraz 3 tabele. Autorka dokonuje klarownego podsumowania wyników oraz ich omówienia w świetle informacji dotyczących roli hipotermii oraz wpływu ekspresji białek szoku cieplnego na wydajność transdukcji wektorem AAV. Dyskusja pozwala na poznanie znaczenia pozyskanych wyników w świetle istniejącej wiedzy, co świadczy o dojrzałości naukowej i umiejętności krytycznego spojrzenia na pozyskane wyniki. Autorka formułuje wnioski w ścisłym powiązaniu z uzyskanymi wynikami badań.

W obowiązku recenzenta pozostaje mi jednak zadać pytania dotyczące związane bezpośrednio ze sposobem wykonywania badań, który mógł wpływać na wyniki i ich interpretację.

- Zastanawiający jest wybór punktów czasowych do oceny ekspresji genów HSP. W publikacji nr 2 i 3 wybrano punkt czasowy 24h po zadziałaniu hipertermii, a jednocześnie nie porównywano zmiany ekspresji tych genów w odpowiedzi na samą transdukcję. Co podyktowało takie a nie inne punkty czasowe? Sam wzrost ekspresji różnych HSP, nazywany przez Autorkę „sygnaturą” nie dowodzi udziału tych białek w poprawie wydajności transdukcji, jest jedynie przesłanką.

- W dyskusji na str. 84 Autorka pisze: „ogólnie liczba kopii *itr* koresponduje z liczbą komórek GFP+, jednak istnieją intrygujące różnice pomiędzy liniami (Ryc. 1)”. Czym można wytłumaczyć różnice obserwowane pomiędzy liczbą kopii sekwencji *itr* a wydajnością

transdukcji mierzoną za pomocą sygnału pochodzącego of GFP+? Na podstawie ryc. 1 w dyskusji trudno jest stwierdzić, że ogólnie liczba kopii sekwencji *itr* koresponduje z sygnałem GFP+, ponieważ można to zaobserwować tylko dla linii CaoV-3 oraz CCD-18Co.

- Otwartym pytaniem w rozprawie pozostaje kwestia gdzie lokował się wektor – w cytoplazmie, integrował się do genomu – w jaki sposób mogło to wpływać na rozrzuty pomiędzy liczbą kopii *itr* a sygnałem od GFP+?

W podsumowaniu, rozprawa doktorska mgr farm. Alicji Bieńkowskiej-Tokarczyk, pominąwszy powyższe usterki, jest napisana starannie, logicznie a poziom merytoryczny świadczy o dojrzałości naukowej Autorki i możliwości jej dalszego rozwoju naukowego.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest oryginalnym i wartościowym dorobkiem mgr farm. Alicji Bieńkowskiej-Tokarczyk wniesionym do wiedzy o roli hipertermii w zwiększaniu wydajności transdukcji komórek nowotworowych za pomocą rekombinowanych wektorów AAV, oraz w rozwoju metodologii terapii genowej co ma istotne znaczenie dla wielu pacjentów z chorobami nowotworowymi czy nieuleczalnymi chorobami jednogenowymi.

Podsumowując, rozprawa doktorska spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i tym samym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani magister farmacji Alicji Bieńkowskiej-Tokarczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk farmaceutycznych.

