

dr hab., prof. UG  
Sylwia Rodziewicz-Motowidło  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 8.01.2019 r.

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Justyny Mączyńskiej**

**pt.: „Reakcja fotoimmunologiczna z zastosowaniem cząsteczek Affibody w komórkach nowotworów HER2-dodatnich” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu**

**(promotorzy: dr hab. Jolanta Saczko, prof. nadzw. oraz dr hab. Gabriela Kramer-Marek)**

Tematyka dysertacji dotyczy badania procesu wiązania i aktywności biologicznej cząsteczek Affibody-IR700 wobec komórek nowotworów HER2-dodatnich. Tematyka pracy doskonale wpisuje się w zapotrzebowanie społeczeństwa na nowe leki o działaniu przeciwnowotworowym. Nowotwory to obecnie główna przyczyna umieralności na świecie. Niestety w Polsce umieralność z powodu nowotworów złośliwych jest dużo wyższa niż w większości państw europejskich. Obserwowany jest stały wzrost zachorowalności na raka m. in. gruczołu sutkowego, jajnika, jelit czy płuc. Obecnie najlepsze wyniki leczenia dają metody oparte na aktywacji układu immunologicznego do walki z nowotworami. Niestety metody te, choć wydłużają długość życia pacjentów to są skuteczne jedynie u ok. 20% z nich. Inne, skuteczne metody walki z nowotworami również wydłużają całkowity czas przeżycia pacjentów, ale u większości z nich ostatecznie rozwija się oporność na leczenie. Pomimo zaangażowania dużych środków finansowych a także znacznego postępu w zakresie diagnostyki i leczenia chorób nowotworowych, istnieje wciąż bardzo duża potrzeba poszukiwania nowych, bardziej skutecznych i spersonalizowanych metod leczenia chorób nowotworowych. Jednym z nowoczesnych rozwiązań, wspomagających terapię leczenia nowotworów jest fotoimmunoterapia (PIT). W metodzie tej wykorzystuje się tzw. koniugaty, czyli połączenia dwóch aktywnych biologicznie cząsteczek chemicznych, posiadających właściwości obu z nich. Metoda PIT wykorzystuje zdolność celowania wysoce specyficznego białka, tzw. nośnika celującego (np. przeciwciała monoklonalnego) połączonego z fotouczulaczem (PS). Cytotoksycznie wobec komórek nowotworowych działają wówczas reaktywne formy tlenu, które powstają po naświetleniu fotouczulacza. Pani Justyna Mączyńska w swojej pracy badała koniugaty złożone z cząsteczek Affibody i cząsteczek fotouczulacza (ftalocyjanina - IR700). Affibody to małe białka imitujące przeciwciała monoklonalne tzw. mimetyki przeciwciał, które oferują znakomitą selektywność wiązania z wyznaczonymi celami molekularnymi. W recenzowanej pracy cząsteczki te zostały wykorzystane do rozpoznawania receptorów HER2, znajdujących się na powierzchni złośliwych komórek nowotworowych. Tematyka pracy doktorskiej mgr inż. Mączyńskiej wpisuje się we współczesne trendy terapii onkologicznych. Nie dziwi więc zainteresowanie Doktorantki tą niezwykle ciekawą tematyką badawczą.

Rozprawa doktorska została wykonana pod opieką dwóch promotorów to jest dr hab. Jolanty Saczko, prof. nadzw. oraz dr hab. Gabrieli Kramer-Marek. Prace doświadczalne były wykonywane w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu oraz w Zespole Przedklinicznego Obrazowania Molekularnego Wydział Radioterapii i Obrazowania *The Institute of Cancer Research*, Londyn, Wielka



Brytania. Doktorantka realizowała swoje badania dzięki finansowaniu z dwóch grantów, których była/jest kierownikiem (tj.: PRELUDIUM NCN oraz ETIUUDA NCN). Drugi z nich obejmował stypendium doktorskie i konieczność realizacji części prac za granicą Polski. Na pochwałę zasługuje fakt, iż Doktorantka samodzielnie zdobyła środki finansowe na swoje badania. Podjęła się także wyjazdu do prestiżowego ośrodka naukowego (The Institute of Cancer Research, Londyn, Wielka Brytania) w którym dokonała część najbardziej interesujących badań tj. obrazowania molekularnego.

Całość rozprawy obejmuje 169 stron maszynopisu i podzielona jest na 7 głównych rozdziałów (tj. wstęp czyli część literaturowa, cel i założenia pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski i literatura). Spis piśmiennictwa obejmuje 334 pozycje a większość cytowanej literatury obejmuje ostatnie pięć lat, co dowodzi na niezwykle aktualną tematykę badawczą recenzowanej rozprawy. W pracy umieszczono kilkanaście wykresów, rysunków, schematów i zdjęć, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Na końcu pracy znajduje się wykaz używanych skrótów. W mojej opinii powinien on się znajdować na początku rozprawy, co ułatwiłoby jej czytanie. Praca ma układ typowy dla prac eksperymentalnych z zakresu nauk przyrodniczych i medycznych. W pracy znalazłam nieliczne błędy edycyjne i stylistyczne (głównie anglicyzmy) (np. „zewnątrz komórki”, str. 20; „ $\alpha$ C-helisy”, str. 21; „receptor jest ekspresjonowany” str. 22, „powolny klirens”, str. 47, „synteza peptydowa”, str. 48) ale w żaden sposób nie umniejszają one wysokiej wartości edycyjnej i merytorycznej pracy.

Warto w tym miejscu dodać, iż rozprawę doktorską mgr inż. Mączyńskiej otwierają trzy cytaty dotyczące „nieuków” (Albert Einstein), „czarodziejskiej baśni” (Maria Skłodowska-Curie) oraz „bezdomności” (Ludwik Pasteur). W mojej ocenie zostały one bardzo dobrze dobrane, gdyż pokazują dużą pokorę Doktorantki wobec nauki, wynalazków i nieodgadnionych jeszcze zjawisk przyrodniczych. Pracę doktorską mgr inż. Mączyńska dedykuje m.in. swojemu mężowi, dzięki któremu „każdego dnia dowiaduje się czym jest szczęście”. Uważam, że niezwykłym szczęściem dla obu Pań promotor było opiekowanie się „szczęśliwą Doktorantką” realizującą przy tym ambitną i ciekawą pracę naukową.

Doktorantka, we „Wstępie” swojej pracy wprowadziła czytelnika w cały zakres tematyki, która jest wymagana do pełnego zrozumienia przeprowadzonych w pracy doświadczeń i uzyskanych wyników. Doskonale wyważyła zakres opisanej problematyki, co jest niezwykłą umiejętnością. Na początku tego rozdziału mgr inż. Mączyńska wprowadziła czytelnika w tematykę markerów molekularnych ze szczególnym naciskiem na opis budowy i działania receptorów HER2. Mam tutaj tylko jedno pytanie dotyczące stwierdzenia, że „badania elektrostatyczne sugerują”. Cóż to za badania? W kolejnym podrozdziałach „Wstępu” Doktorantka opisała rodzaje/typy nowotworów posiadających nadekspresję genu *HER2* oraz terapie celowane stosowane w leczeniu nowotworów HER2 pozytywnych. Na zakończenie rozdziału („Wstęp”) mgr inż. Mączyńska wyjaśniła od strony molekularnej i medycznej na czym polegają terapie fotodynamiczne. W zakresie tej części pracy nasunęły mi się trzy pytania. Czy można powiedzieć, jak napisała Doktorantka, że cechą uczulaczy powinna być wysoka czystość chemiczna (str. 34)? Co oznacza według Doktorantki pojęcie „rozpuszczalnika biologicznego” (str. 35) oraz, że „PDT daje bardzo dobry efekt kosmetyczny” (str. 43)? Tą część rozprawy doktorskiej („Wstęp”) oceniam bardzo wysoko, gdyż Doktorantka w sposób przejrzysty wprowadziła czytelnika w problematykę dysertacji. Przegląd literaturowy został dokonany niezwykle starannie i świadczy o dużej wiedzy i swobodnym poruszaniu się Doktorantki w obrębie wiedzy z zakresu: biochemii, biologii komórki oraz chemii i fizyki medycznej.

W kolejnej części pracy („Cel pracy”) mgr inż. Mączyńska przedstawiła cel swojej pracy, którym było **opracowanie i ocena efektywności koniugatu Affibody-IR700 ukierunkowanego na receptor HER2 (Affi<sub>HER2</sub>-IR700) w oparciu o modele raka jajnika i piersi *in vitro* i *in vivo*.**



Celami szczegółowymi recenzowanej dysertacji było:

- (1) skoniugowanie cząsteczek Affibody z ftalocyjaniną (IR700),
- (2) ustalenie optymalnych warunków kinetyki wiązania koniugatów,
- (3) zbadanie efektu terapeutycznego *in vitro* na liniach komórkowych (2D oraz 3D) różniących się nadekspresją receptora HER2,
- (4) zbadanie zdolności PIT do indukowania immunogennej śmierci komórkowej,
- (5) ocena odpowiedzi terapeutycznej koniugatu *in vivo* na modelach ksenograftów z nadekspresją receptora HER2.

Po wstępie teoretycznym i przedstawieniu celu pracy Doktorantka w sposób zwięzły jak na ilość przeprowadzonych eksperymentów (20 stron) opisała stosowane przez siebie metody i techniki. Warto nadmienić, iż zastosowane przez Doktorantkę metody obejmują techniki stosowane w różnych dyscyplinach naukowych w takich jak: chemia, biochemia, histologia, biologia molekularna i weterynaria. W zakresie tego rozdziału mam tylko jedną uwagę dotyczącą braku informacji o sekwencji aminokwasowej stosowanego w badaniach Affibody. Zastosowane przez Doktorantkę metody są standardowe i powszechnie używane ale za to wymagające doświadczenia laboratoryjnego, precyzji a czasami nawet odwagi (mam tutaj na myśli doświadczenia na zwierzętach).

Kolejny rozdział pracy, zatytułowany „Wyniki”, został przez Doktorantkę podzielony na pięć zasadniczych części tj.: (i) charakterystyka wybranych linii komórkowych, (ii) charakterystyka koniugatu Affi<sub>HER2</sub>-IR700, (iii) reakcja fotoimmunologiczna *in vitro*, (iv) markery immunogennej śmierci komórkowej oraz (v) reakcja fotoimmunologiczna *in vivo*. Kolejność prac eksperymentalnych została dobrana prawidłowo. W swojej pracy mgr inż. Justyna Mączyńska w pełni scharakteryzowała i przebadła koniugat Affi<sub>HER2</sub>-IR700 w zakresie aktywności przeciwnowotworowej wobec różnych linii komórkowych (hodowle 2D), aby ostatecznie wyselekcjonować do dalszych badań dwie linie o najlepszych parametrach tj. SKOV-3 oraz BT-474. Dalsze prace eksperymentalne Doktorantka prowadziła na wyselekcjonowanych liniach, ale używając tzw. hodowli sferoidowych (3D), które znacznie lepiej oddają rzeczywiste środowisko guza nowotworowego. W kolejnym etapie przebadła wpływ reakcji fotoimmunologicznej na komórki oraz sprawdziła jakie mechanizmy komórkowe są aktywowane w komórkach pod wpływem fotouczulaczy. Zwieńczeniem jej badań były doświadczenia *in vivo* podczas których oceniła efektywność terapeutyczną badanych koniugatów Affi<sub>HER2</sub>-IR700. Reasumując, Doktorantka pokazała, że koniugat Affi<sub>HER2</sub>-IR700 wiąże się z receptorem HER2 lepiej niż koniugat przeciwciała-FITC, zarówno w hodowlach 2D i 3D jak i w testach *in vivo*. Pani mgr inż. Mączyńska zastosowała właściwe metody i procedury wymagane do przeprowadzenia zaplanowanych eksperymentów. Jedynym eksperymentem, którego nie jestem w stanie ocenić są badania histologiczne. Z uwagi na moje braki w wykształceniu w zakresie histologii bardzo proszę o objaśnienie zdjęć histologicznych skrawków badanych komórek lub guzów. Proszę również o interpretację uzyskanego wyniku o istotności statystycznej uzyskanego dla kontroli nietraktowanej (Rys. 4.23).

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Dyskusja” Doktorantka przedstawiła najważniejsze wyniki swojej pracy doktorskiej i ukazała je w świetle dotychczasowych badań opisanych w literaturze. Przeprowadzona przez Doktorantkę dyskusja jest bardzo spójna i merytoryczna. Pytania jakie mógłby postawić Recenzent stawia w dyskusjach sama Doktorantka, co dowodzi jej dużej dojrzałości naukowej. Do najważniejszych osiągnięć pracy stanowiących jednocześnie element nowości naukowej zaliczam (i) wykazanie przez Doktorantkę wysokiej specyficzności koniugatu Affi<sub>HER2</sub>-IR700 w wiązaniu receptorów HER2 na modelach *in vitro* oraz *in vivo*, (ii) udowodnienie skuteczności terapeutycznej koniugatu na HER2-pozytywnych komórkach raka piersi i jajnika oraz (iii)





UNIWERSYTET GDAŃSKI



pokazanie że fluorescencyjny koniugat Affi<sub>HER2</sub>-IR700 wskazuje potencjał jako środek w leczeniu śródoperacyjnym w zastosowaniu do wyznaczenia bezpiecznych marginesów guza oraz do usuwania resztkowych komórek nowotworowych przy użyciu PIT. Na zakończenie chciałabym podkreślić, iż przedstawiona do oceny praca doktorska zainspirowała mnie do zastosowania białek Affibody do moich własnych badań. Można więc rzec, że Doktorantka uczyniła mnie „szczęśliwym Recenzentem”.

Przytoczone w niniejszej nieliczne uwagi krytyczne oraz kwestie dyskusyjne nie mają istotnego charakteru i nie podważają w żadnej mierze wartości rozprawy i mojej bardzo pozytywnej jej oceny. Reasumując, uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana, wyniki zostały zinterpretowane poprawnie a cel pracy został w pełni zrealizowany. Rozprawa doktorska mgr inż. Justyny Mączyńskiej zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny dotyczący wykorzystania koniugatu Affi<sub>HER2</sub>-IR700 do terapii nowotworowej. Kandydatka wykazała się ponadto znajomością wielu technik eksperymentalnych oraz szeroką i interdyscyplinarną wiedzą. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż uzyskane wyniki badań mają wysoki potencjał publikacyjny i z pewnością znajdą swój finał w postaci publikacji o wysokim współczynniku wpływu. Na opublikowany dorobek mgr inż. Justyna Mączyńskiej łącznie składa się 10 artykułów opublikowanych w czasopismach indeksowanych w JCR (Suma IF: 18.605 Suma Pkt. MNiSW/KBN: 185).

Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym z późn. zm. W tym odniesieniu wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Justynę Mączyńską do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, mając na względzie wkład pracy Doktorantki w prace nad poszerzeniem wiedzy w zakresie nowej cząsteczki terapeutycznej Affi<sub>HER2</sub>-IR700, zwracam się także do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.

Z poważaniem,

Sylvia Radziejewska-Kobusik