

Zakład Biologii Komórki
Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny
Laboratoryjnej
w Sosnowcu
Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach

41-200, Sosnowiec

ul. Jedności 8

www.sum.edu.pl

Kierownik zakładu
dr hab.n.med. Małgorzata Latocha

tel.: (+48 32) 364 12 10-14
fax: (+48 32) 364 12 11

SEKRETARIAT

tel.: (+48 32) 364 12 10

fax: (+48 32) 364 12 11

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Justyny Marii Mączyńskiej
pt.: "Reakcja fotoimmunologiczna z zastosowaniem cząsteczek
Affibody w komórkach nowotworów HER2-dodatnich"**

**Promotor: dr hab. Jolanta Saczko, prof. nadzw.
dr hab. Gabriela Kramer-Marek**

Diagnostyka i terapia nowotworów to obecnie jedno z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny. Mimo ogromnego postępu nauki i ciągle rosnących nakładów uzyskiwane do tej pory efekty są w wielu przypadkach niezadawalające. Ograniczona skuteczność prowadzonych terapii, pojawiająca się lekooporność, sprawiają że wiele poszukiwań koncentruje się wokół tzw. terapii celowanych. Coraz większa znajomość różnic budowy i funkcjonowania komórek prawidłowych i nowotworowych daje nadzieję na opracowanie specyficznych, ukierunkowanych na patologiczne komórki działań terapeutycznych.

W tym kontekście temat podjęty przez Doktorantkę - "*Reakcja fotoimmunologiczna z zastosowaniem cząsteczek Affibody w komórkach nowotworów HER2-dodatnich*", wydaje się niezwykle istotny i zważywszy na wskazywaną rolę obecności receptorów HER2 (występuje w wielu typach nowotworów i wiąże się z wysoką agresywnością) doskonale wpisuje się w poszukiwania nowych metod walki z nowotworami.

Przedłożona mi do oceny praca liczy 169 stron i składa się z typowych dla tego rodzaju pracy rozdziałów: *Streszczenia (w języku angielskim i polskim), Spisu treści, Wstępu, Celu i założeń pracy, Materiałów i metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków, Bibliografii oraz Suplementów (Wykazu skrótów, Wykazu tabel i Wykazu rysunków).*

W I rozdziale pracy („Wstęp”) liczącym 38 strony Doktorantka, po krótkim wprowadzeniu, w sposób bardzo przejrzysty i zrozumiały omawia zagadnienia dotyczące receptorów HER (struktura, aktywacja, sygnalizacja, nowotwory HER2 dodatnie), terapię celowaną, terapię fotodynamiczną, fotoimmunoterapię.

W rozdziale „Cel i założenia pracy” Autorka wyraźnie określa jakie były założenia pracy i jakie postawiła przed sobą cele do zrealizowania - ..."*koniugacja cząsteczek Affibody z ftalocyjaniną (IR700), ustalenie optymalnych warunków kinetyki wiązania immunokonjugatów oraz zbadanie efektu terapeutycznego in vitro na liniach komórkowych (2D oraz 3D) różniących się nadekspresją receptora HER2. Ponad to: ocena zdolności PIT do indukowania immunogennej śmierci komórkowej i odpowiedzi terapeutycznej koniugatu in vivo na modelach ksenograftów z nadekspresją receptora HER2*"... - bardzo ambitne plany z szeroko zakrojonymi badaniami (zawierające zarówno badania w układzie *ni vitro*, jak i badania na zwierzętach) i dobrze przemyślane. Potwierdzeniem tego jest też dobór materiału badawczego i metod jakie Doktorantka zaplanowała do swoich badań.



Bardzo pozytywnie oceniam projekt planu przebiegu całego projektu badawczego - już od pierwszego etapu, kiedy to Doktorantka sama postanowiła potwierdzić obecność receptora HER2 w badanych komórkach i samodzielnie przeprowadzić analizę jego ekspresji (nie opierając się tylko na danych literaturowych) w wykorzystywanych w pracy liniach: SKOV-3 – ludzka linia komórkowa gruczolaka jajnika; BT-474 – ludzka linia komórkowa raka przewodowego gruczołu sutkowego; MDA-MB-175 – ludzka linia komórkowa raka przewodowego gruczołu sutkowego, pobrana z miejsca przerzutu – wysięku opłucnej; MDA-MB-231 – ludzka linia komórkowa gruczolaka gruczołu sutkowego, pobrana z miejsca przerzutu – wysięku opłucnej; MDA-MB-468 – ludzka linia komórkowa gruczolaka gruczołu sutkowego, pobrana z miejsca przerzutu – wysięku opłucnej.

Wszystkie planowane prace i zadania zostały w bardzo przejrzysty sposób opisane. Warto podkreślić, że badania przeprowadzone w pracy doktorskiej były finansowane w ramach grantu PRELUDIUM 10 (2015/19/N/NZ7/01336) Narodowego Centrum Nauki oraz że Doktorantka uzyskała środki finansowe w ramach finansowania stypendium doktorskiego ETIUDA 4 (2016/20/T/NZ7/00522) Narodowego Centrum Nauki - co przy tak merytorycznie przygotowanym projekcie jest w pełni zrozumiałe. Badania wykonano w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (kierownik Katedry i Zakładu Biochemii Lekarskiej prof. dr hab. Andrzej Gamian) oraz w Zespole Przedklinicznego Obrazowania Molekularnego Wydział Radioterapii i Obrazowania The Institute of Cancer Research Londyn, Wielka Brytania (kierownik zespołu Dr hab. Gabriela Kramer-Marek).

W badaniach, poza klasyczną hodowlą 2D (monowarstwową) komórek, wykorzystano również hodowle trójwymiarowe 3D. To powszechnie uznawany model *in vitro* małych guzów nowotworowych. Do charakterystyki linii komórkowych pod względem ekspresji receptora HER2 Doktorantka zastosowała metodę cytometrii przepływowej, a w celu charakterystyki białek wybranych linii komórkowych metodę Western blot (WB).

W pracy, jako fotouczulacz zastosowano barwnik ftalocyjaninowy IRDye700DX-maleimid (IR700; 1979.28 Da; LI-COR Bioscience) charakteryzujący się fluorescencją w zakresie bliskiej podczerwieni (maksimum wzbudzenia $\lambda=689$ nm, maksimum emisji $\lambda=700$ nm), a jako cząsteczki targetujące wykorzystano małe białko Affibody (ZHER2:2891-Cys, 6995.82 Da), specyficznie rozpoznające zewnątrzkomórkową domenę receptora HER2. Przeprowadzono koniugację AffiHER2 z IR700, a następnie określono stężenie i czystość koniugatu, specyficzności wiązania i stałą dysocjacji oraz specyficzność i lokalizację komórkową AffiHER2-IR700. Eksperymenty związane z oceną reakcji fotoimmunologicznej i efektów terapeutycznych *in vitro* prowadzono na komórkach w hodowlach 2D oraz 3D z koniugatem AffiHER2-IR700 w stężeniu 0.01 - 1 μM naświetlanych za pomocą oświetlacza wyposażonego w podczerwone diody LED (oświetlacz o wysokiej mocy wyjściowej złożony z 60 wysokowydajnych układów diodowych; L690-66-60, Marubeni America Corporation), które emitują światło ciągłe o długości fali 690 nm ze średnią intensywnością 12,5 mW/cm^2 , natężenie prądu 285 mA, przy czasie naświetlania 640s lub 1280s - co odpowiada dawce gęstości energii promieniowania równej 8 lub 16 J/cm^2 .

Ocenę przeżywalności komórek przeprowadzono metodą bioluminescencyjną z zastosowaniem testu CellTiter-Glo® (Promega), ocenę żywotności sfer komórkowych wykorzystując zestaw do jednoczesnego barwienia żywych i martwych komórek (LIVE/DEAD™ Cell Imaging Kit, Thermo Fisher Scientific). Ilościowy pomiar RFT po naświetleniu komórek wykonano przy pomocy zestawu DCFDA (Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit, Abcam) oraz odczynnika pozwalającego na oznaczanie tlenu singletowego, $^1\text{O}_2$ (SOSGR, Singlet Oxygen Sensor Green Reagent, Molecular Probes). Analizowano również rodzaj śmierci komórek wykorzystując w procedurze FFC jodek propidyny i aneksynę V. Jako marker immunogenicznej śmierci komórkowej oznaczano: 1) translokację kalretikuliny na błonę komórkową - obrazowanie za pomocą mikroskopu konfokalnego, 2) oznaczenia białka HMGB1 uwalnianego z komórek - metodą ELISA (HMGB1 ELISA kit, Tecan, IBL International), 3) zmiany w komórkach zachodzących na poziomie białek związanych z immunogenną śmiercią komórkową: białka szoku cieplnego HSP70 i HSP90 oraz białko HMGB1 - techniką immunoidentyfikacji Western blot, 4) oznaczenie uwalniania ATP z umierających komórek - test ENLITEN® (Promega).

Badania *in vivo* prowadzono w Londynie wykorzystując myszy szczepu NSG™-Nude (*NOD.Cg-Foxn1nullPrkdcscid1l2rgnull/ICR*) (z Charles River Laboratories, hodowane jako wewnętrzne kolonie rozrodcze w zwierzętarni the Institute of Cancer Research w Londynie, Wielka Brytania) - przeznaczone do silnego wspomaganie tworzenia ksenoprzeszczepów ludzkich komórek nowotworowych. Szczep ten charakteryzuje się obniżoną odpornością, wynikającą z braku dojrzałych limfocytów T, komórek B, funkcjonalnych komórek NK oraz posiadających zmniejszoną liczbę dendrytycznych komórek szpikowych i wykazujących niedobór przekazywania sygnałów przez cytokiny. Przeznaczone są do silnego wspomaganie tworzenia ksenoprzeszczepów ludzkich komórek rakowych. Wszystkie eksperymenty *in vivo* - jak deklaruje Doktorantka - przeprowadzono zgodnie prawem (licencja wydana na podstawie brytyjskiej Ustawy o Zwierzętach dotycząca procedur naukowych z 1986 r.) oraz zgodnie z lokalną oceną etyczną. Badania były zgodne z wytycznymi Brytyjskiego Narodowego Instytutu Badań nad Rakiem dotyczącymi dobrostanu zwierząt w badaniach nad rakiem (ang. *the United Kingdom National Cancer Research Institute Guidelines for Animal Welfare in Cancer Research*). Guzy nowotworowe otrzymywane były poprzez podskórne iniekcje komórek rakowych linii SKOV-3 lub BT-474 w okolice prawego przedramienia myszy. Sprawdzano biodystrybucję AffiHER2-IR700. Różne ilości AffiHER2-IR700 (0,5, 3 lub 18 µg) wstrzykiwano dożylnie, a następnie myszy obrazowano za pomocą systemu IVIS® Spectrum/CT (Perkin Elmer) po 0,5, 1, 3, 6 i 24 godzinach od podania koniugatu. Obrazy opracowywano za pomocą dedykowanego oprogramowania *Living Image® 4.5.2*. W badaniach reakcji fotoimmunologicznej myszy z AffiHER2-IR700 naświetlano 100 J/cm². Ze względu na ograniczoną ilość dostępnego białka nie utworzono grupy z podaniem AffiHER2-IR700 bez naświetlania – SZKODA! Przed oraz po naświetlaniu myszy poddawane były obrazowaniu fluoroscencyjnemu (monitorowano je codziennie), objętość guza mierzono co drugi-trzeci dzień, a następnie po osiągnięciu przez guzy objętości ~500 mm³ myszy uśmiercano, a tkanki poddano analizie immunohistochemicznej.

Uzyskane wyniki Doktorantka klarownie przedstawiła na 43 stronach rozdziału „Wyniki” - bogato ilustrowanego, zawierającego szereg wykresów i konkretnych spójnych opisów. Przejrzysty, znakomicie przygotowany rozdział!

Kolejny - IV rozdział pracy to „Dyskusja”, która stanowi 24-stronicowe omówienie uzyskanych wyników na tle danych literaturowych. Doktorantka naświetla przyczyny zainteresowania się tematem i podaje szczegóły związane wyborem fotouczulacza oraz zastosowaniem koniugatu Affibody-IR700. Stając przed karkołomnym zadaniem opisania tak wielu uzyskanych wyników i to jeszcze w odniesieniu do wybranych danych literaturowych Doktorantka wyodrębniła w „Dyskusji” podrozdziały dotyczące: charakterystyki koniugatu AffiHER2-IR700, efektów reakcji fotoimmunologicznej komórek w hodowlach 2D, w hodowlach komórek 3D, oraz zaobserwowanych dla modelu badawczego *in vivo*. Rozdział ten kończy krótkie podsumowanie.

W kolejnym rozdziale na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała 12 wniosków końcowych. To dużo, ale wszystkie odnoszą się do zaplanowanych zadań, a przy tak ogromnej ilości prac badawczych, trzeba powiedzieć, że i tak udało się Doktorantce zebrać najważniejsze informacje w bardzo skondensowany sposób. Wszystkie wnioski są jasno i przejrzysto sformułowane.

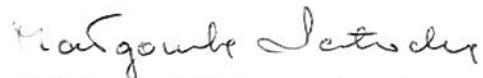
Na końcu rozprawy zamieszczone zostały rozdziały : „Wykaz skrótów”, „Wykaz rycin”, „Wykaz tabel”.

Jestem pełna uznania dla Doktorantki, jej przygotowania, wiedzy oraz pracy jaką wykonała realizując zaplanowane badania i przygotowując tak przejrzyste i starannie opracowanie wyników w postaci, przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Justyny Marii Mączyńskiej pt.: „Reakcja fotoimmunologiczna z zastosowaniem cząsteczek Affibody w komórkach nowotworów HER2-dodatnich” spełnia wymogi określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr 65, poz. 595, z

póź.zm.) stawiane rozprawom doktorskim. Zwracam się Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego, Uniwersytetu Medycznego im Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie *mgr inż. Justyny Marii Mączyńskiej* do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Duże walory aplikacyjne pracy, aktualność tematu podjętego Doktorantkę i bardzo obiecujące wyniki pracy w aspekcie tak powszechnego problemu jakim jest obecnie terapia nowotworów, oraz bardzo wysoka jakość przygotowanego opracowania są również podstawą mojego wniosku do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego, Uniwersytetu Medycznego im Piastów Śląskich we Wrocławiu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej *mgr inż. Justyny Marii Mączyńskiej*.



Dr hab.n.med.Małgorzata Latocha

Kierownik Zakładu Biologii Komórki
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach