

Prof. dr hab. Małgorzata Kuliszkiwicz-Janus
Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu
Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
50-370 Wrocław, Wyb. Pasteura 4
tel. (48)(71) 784 2604
e-mail: malgorzata.kuliszkiwicz-janus@umed.am.wroc.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Justyny Meissner “Liposomowa postać kompleksu oligonukleotyd-polietylenoimina w celowanej terapii ludzkich nowotworów krwi”

Wzrastająca z każdym rokiem zachorowalność na nowotwory złośliwe i coraz większa ich oporność na leczenie sprawia, że konwencjonalna chemio- i radioterapia nie zadowala. Należy zatem poszukiwać zarówno nowych leków jak i sposobów ich podawania. Takich, by terapia uwzględniała specyfikę nowotworu, indywidualność osobniczą osoby chorej, czynniki wskazujące na oporność, a co najważniejsze działała wybiórczo na komórki nowotworowe, oszczędzając równocześnie komórki zdrowe.

Terapia genowa, czyli technika wprowadzania materiału genetycznego (DNA lub RNA) do komórek w celu wywołania efektu terapeutycznego lub prewencji wystąpienia choroby, podejmuje się tego zadania. Można dzięki niej wprowadzić gen, powodując wymianę wadliwego genu w komórkach somatycznych organizmu i zastąpieniu go właściwą kopią. Można też hamować ekspresję genu. Polega to na blokowaniu biosyntezy białka przez zmianę ekspresji genów na poziomie mRNA. Efektem obu dróg jest apoptoza komórek nowotworowych lub znaczne spowolnienie ich wzrostu. Wyróżnia się trzy główne typy strategii anti-mRNA: (1) wykorzystanie jednoniciowych oligonukleotydów antysensowych, (2) trawienie RNA przez katalitycznie aktywne oligonukleotydy, (3) wykorzystanie zjawiska interferencji RNA. Terapia genowa może być stosowana samodzielnie, jak również w skojarzeniu z przeciwciałami oraz chemio i radioterapią.

Praca doktorska mgr Justyny Meissner liczy 134 strony maszynopisu, zawiera 34 ryciny i 11 tabel. Bibliografia, to bogaty zbiór obejmujący 327 pozycji bardzo aktualnej literatury światowej, z której około 12% to prace opublikowane już w roku 2014. Autorka nie rezygnuje jednak z prac obejmujących doniesienia z lat wcześniejszych 80. i 90.

Obszerny wstęp rozprawy składa się z czterech podrozdziałów, w których autorka kolejno, bardzo dokładnie ilustrując rycinami przedstawia zagadnienia dotyczące patogenezy chorób nowotworowych układu krwiotwórczego, a także znaczenia krótkich fragmentów RNA i DNA jako narzędzi terapii genowej. Omawia ponadto niewirusowe systemy dostarczania leków genetycznych, a także wskazuje na trudności napotymane przy realizacji wprowadzania nowego leku na rynek, od momentu powstania pomysłu do jego realizacji, czyli otrzymania produktu.

Celem pracy było nie tylko skonstruowanie preparatu o charakterze hybrydowym, łączącym cechy liposomów oraz polimerów kationowych, który miałby zastosowanie jako nośnik leków genetycznych w terapii kierowanej, ale również zabezpieczenie jego trwałości oraz sprawdzenie funkcji zarówno na modelach *in vitro*, jak i *in vivo*. Wydaje mi się, że dla jasności i

przejrzystości tekstu można było kolejne kroki postępowania przedstawić w punktach, wyjaśniając co jest motywem takiego, a nie innego działania.

W części poświęconej metodologii autorka przedstawia bardzo szczegółowo zarówno potrzebne do eksperymentu materiały jak i sposoby przeprowadzenia doświadczeń, opisując kolejno wraz ze wszystkimi detalami poszczególne etapy badań.

Wykorzystuje do nich 8 rodzajów linii komórkowych: chłoniaka Burkitta, ludzkiej i mysiej ostrej białaczki limfoblastycznej, ludzkiej białaczki promielocytowej, linii komórek erytroleukemicznych oraz raka szyjki macicy, jak również jednojądrzaste komórki z krwi obwodowej pacjentów ze zdiagnozowaną przewlekłą białaczką limfatyczną. Za zwierzęta doświadczalne posłużyły w pracy samce myszy szczepu NOD/SCID.

Doktorantka opisuje sposób przygotowania liposomów t-LP z rdzeniem DNA/PEI kierowanych przeciwciałami, metodę przyłączania przeciwciał i enkapsulacji kalceiny. Następnie stosuje metody analityczne sprawdzające stabilność i trwałość preparatu (średnica liposomów, potencjał Zeta, stężenie DNA, poziom uwalniania kalceiny, elektroforeza DNA). Poddaje też analizie właściwości biologiczne stosując test redukcji zarówno soli tetrazolowej MTT, jak i soli sodowej rezazuryny. Bada aktywność hemolityczną krwi w obecności liposomów. Przeprowadza elektroforezę SDS-PAGE oraz cytofotometrycznie analizuje stopień apoptozy lub nekrozy. Przygotowuje preparaty do oceny w mikroskopii konfokalnej. Testem immunoenzymatycznym ELISA oznacza ilościowo przyłączone do powierzchni liposomów przeciwciała, a metodą jakościową Bradford i metodą z kwasem bis-cynchoninowym białko całkowite.

Kolejny etap badań to eksperymenty *in vivo* przeprowadzane na samcach myszy, a w nich badanie biodystrybucji preparatu tL-P, analiza czasu przebywania liposomów w krwioobiegu oraz skuteczność terapeutyczna preparatu.

Wyniki badań prowadzone we wszystkich możliwych kombinacjach są imponujące, poparte przejrzystymi, zrozumiałymi, dobrze udokumentowanymi rycinami.

Elastycznie przeprowadzona dyskusja wskazuje na możliwość zastosowania zaprojektowanego, stworzonego i sprawdzonego przez Doktorantkę nowego, ukierunkowanego nośnika lipidowego umożliwiającego dostarczenie kompleksu polikationu (polietyloiminy) z lekiem genetycznym (sekwencja oligonukleotydów antysensowych zgodną z lekiem Oblimersen bez fosforotioanowej modyfikacji wiązania fosfordwuestrowego skierowaną przeciwko sześciu pierwszym kodonom transkryptu genu *BCL2*) oraz substancją kierującą (przeciwciała terapeutyczne Rituximab, rozpoznające antygen CD20) na skalę przemysłową. Roztacza również perspektywy nowoczesnej ukierunkowanej terapii nowotworów.

Precyzyjna praca analityczna, mnogość doświadczeń, których się Doktorantka podjęła wykazały, że nośnik liposomowy tL-P spełnia wszystkie wymagania dla wektorów kwasów nukleinowych znajdujących potencjalne zastosowanie w celowanej terapii genowej. Pieczołowicie udowodniła, że charakteryzuje się on stabilnością średnicy i potencjału Zeta. Ponadto zdolnością utrzymywania zamkniętego DNA podczas wielomiesięcznego przechowywania, a także odpornością na składniki ludzkiej surowicy. Charakteryzuje się on też dobrymi właściwościami ochronnymi przed działaniem enzymów nukleolitycznych, skutecznością wobec komórek noszących odpowiedni antygen i brakiem toksyczności wobec komórek pozbawionych tego antygeny. Skutecznie też wycisza ekspresję genu *BCL-2*, co wykazano poprzez znaczne zmniejszenie stężenia białka BCL-2 w analizie immunobloting komórek traktowanych tym preparatem. Najważniejszym osiągnięciem jest wysoka skuteczność nośnika tL-P wobec wybranego nowotworu w doświadczeniach *in vivo* przeprowadzonych na zwierzętach. Nośnik może być również stosowany w terapii skojarzonej z niskimi dawkami cytostatyków. Przez zahamowanie ekspresji genu *BCL2* preparat wywołuje apoptozę nawet w opornych na leczenie komórkach nowotworowych, czyniąc je bardziej podatnymi na terapię. Biorąc pod uwagę, że w przeprowadzonych eksperymentach obserwowano całkowitą remisję nowotworów CD20 dodatnich oraz przeżycie wszystkich myszy doświadczalnych, którym podano tL-P z rdzeniem asODN "anty Bcl-2" można się spodziewać skuteczności tego preparatu u pacjentów z rozpoznąną, oporną białaczką limfatyczną. Ma to szczególne znaczenie u osób, u których zastosowanie li tylko chemio- i radioterapii daje niepowodzenie w około 20%.

Rzetelność stosowanych metod pozwoliła na zgłoszenie uniwersalnego systemu: wektor liposomowy-lek genetyczny-swoiste przeciwciało do uzyskania patentu. Uzyskanie go będzie ewidentnym, obiektywnym potwierdzeniem wartości pracy.

Uwagi moje dotyczą przede wszystkim wartości przedstawienia pracy. Dotyczy to m.in. wyjaśniania skrótów. Z jednej strony, powtarzających się wielokrotnie wraz z ponownymi wyjaśnieniami w tekście, mimo umieszczenia ich w "Wykazie stosowanych skrótów i symboli", a z drugiej nie umieszczenie ich w ogóle w ww. rozdziale.

Brak spisu tabel i rycin.

W tekście autorka używa nieprawidłowych znaczeń wyrazów np. układ krwionośny, czyli krążenia - dotyczy układu zamkniętego zbudowanego z naczyń i serca w którym krąży krew, a powinno być układ krwiotwórczy, czyli grupa narządów, w którym wytwarzane są elementy morfotyczne krwi.

Pojęcie krwiobiegu, czy krwioobiegu. Jedna i druga forma jest poprawna, choć więcej zwolenników ma forma pierwsza. Dobrze byłoby używać w tekście jednej formy.

"Zaprojektowano nowy, kierowany nośnik" - nie jest on przez nikogo kierowany, tylko ukierunkowany na dany typ komórek.

Takich językowych błędów jest w tekście sporo, powyższe przytoczyłam dla przykładu.

Konstruowanie bardzo długich zdań, oraz powtarzanie niektórych fraz np. dotyczących stosowania terapii celowanych zamazuje jasność przytaczanych myśli. Warto nad stylem popracować.

Dla łatwiejszego zrozumienia nazw licznej grupy nowych leków można by się pokusić o wyjaśnienie ich genezy np. mab - przeciwciało monoklonalne, tu - przeciw guzom, xi - chimeryczne, zu - humanizowane, mo - mysie, u- ludzkie.

Uwagi moje w niczym jednak nie ujmują wartości pracy, ale zastosowanie się do nich spowodowałoby, że byłaby dostępniejsza w przyswojeniu.

Biorąc pod uwagę bardzo szeroki zakres przeprowadzonych eksperymentów oraz uzyskane interesujące, konsekwentnie przeprowadzone wyniki badań należy uznać, że cel pracy doktorskiej mgr Justyny Meissner został w pełni osiągnięty. Rozprawa doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom. Wkład pracy doktorantki jest imponujący, w szczególności dotyczy użycia wielu mozolnych technik badawczych i konsekwentnego przeprowadzania badań. Wniosuję wobec powyższego do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego nie tylko o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego, zgodnie z ustawą z dnia 18.03.2011, ale także o wystąpienie z wnioskiem o jej nagrodzenie.

Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Kuliszkievicz-Janus



Wrocław, dnia 12 listopada 2014 rok