

Prof. dr hab. Grażyna Korczak-Kowalska
Zakład Immunologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Łupickiej-Słowik,

zatytułowanej:

**Otrzymywanie przeciwciał IgY specyficznych wobec ludzkich markerów
nowotworowych**

Diagnostyka i terapia chorób nowotworowych, to jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny. Śmiertelność związana z rozwojem tych chorób jest nie tylko dominująca, ale ma często tendencję wzrostową. Tak więc, nie tylko rozwój terapii przeciwnowotworowych, ale również wczesne wykrycie zmian nowotworowych i monitorowanie leczenia ma ogromny wpływ na skuteczność podejmowanej terapii. Powodzenie terapii zależy też w dużym stopniu od zaawansowania choroby. Dlatego tak ważny jest rozwój badań nad projektowaniem testów diagnostycznych, które można zastosować w badaniach przesiewowych jak również do monitorowania przebiegu leczenia. Testów o wysokiej czułości i swoistości rozpoznawania antygenu, ale również testów dających możliwość szybkiej i bezpośredniej oceny wyniku badania.

W ten nurt poszukiwań wpisują się również badania prowadzone przez mgr Agnieszkę Łupicką-Słowik. Doktorantka postanowiła sprawdzić możliwość zastosowania kurzych poliklonalnych przeciwciał klasy Y, swoistych wobec wybranych ludzkich markerów nowotworowych, do konstrukcji testów immunoenzymatycznych i lateralnych.

Doktorantka osiągnęła wszystkie zaplanowane cele. Otrzymała poliklonalne przeciwciała klasy IgY swoiste wobec badanych ludzkich markerów nowotworowych (PSA, CA 15-3 i ADA) oraz wobec wybranych epitopów peptydowych tych białek. Zgadzam się z Doktorantką, że jedną z zalet przeciwciał IgY jest nieinwazyjna, stosunkowo prosta i wydajna metoda ich izolacji. Ponadto, duża odległość filogenetyczna między ptakami i ssakami pozwala uzyskać przeciwciała swoiste wobec wielu antygenów, w tym wobec wysoce konserwatywnych, co jest szczególnie ważne w diagnostyce chorób nowotworowych.

Ponadto, immunoglobuliny IgY nie reagują z wieloma antygenami człowieka, co pozwala na ograniczenie nieswoistych reakcji prowadzących do uzyskiwania fałszywie pozytywnych wyników testów serologicznych. Tak więc wiele danych sugeruje, że może to być skuteczny wybór. Wiadomo również, że już wcześniej Europejskie Centrum Walidacji Metod Alternatywnych rekomendowało wykorzystanie immunoglobulin IgY jako zamiennika immunoglobulin IgG ssaków.

Doktorantka przeprowadziła analizę biochemiczną otrzymanych przeciwciał, oceniając swoistość przeciwciał i dojrzewanie ich awidności w czasie procesu immunizacji, wyznaczyła limity detekcji antygenów oraz zbadała miano przeciwciał IgY. Wykazała wysoką awidność i swoistość przeciwciał wobec badanych antygenów. Analizowała również zdolność do krzyżowej reaktywności otrzymanych przeciwciał. Porównała w końcu reaktywność otrzymanych przeciwciał IgY z reaktywnością komercyjnie dostępnych immunoglobulin IgG. Doktorantka wykazała, że przeciwciała uzyskane w jej badaniach na drodze immunizacji kur fragmentami peptydowymi białek markerowych wykazały reaktywność krzyżową wobec natywnych białek.

Ważnym etapem badań było określenie, czy wyizolowane immunoglobuliny IgY można zastosować do detekcji badanych antygenów nowotworowych człowieka.

Doktorantka opracowała prototyp testów diagnostycznych, zarówno półilościowe testy immunochromatograficzne, jak i ilościowe testy immunoenzymatyczne podwójnego wiązania.

W teście immunoenzymatycznym fazy stałej typu kanapkowego zastosowano dwa warianty. W wariacie IgG/IgY jako przeciwciała wychwytyjące wykorzystano komercyjnie dostępne monoklonalne przeciwciała ssacze IgG swoiste wobec antygeny, a jako przeciwciała detekcyjne wyizolowane przeciwciała IgY. W drugim wariacie zastosowano tylko otrzymane przeciwciała IgY swoiste wobec badanego antygeny, zarówno wychwytyjące jak i detekcyjne. Doktorantka wykazała, że jej prototyp testu może być wykorzystywany do oznaczeń całkowitego stężenia białka PSA w surowicy pacjenta.

W teście immunochromatograficznym wykorzystano modyfikowane swoistymi przeciwciałami nanocząstki złota jako czynnik detekcyjny. Testy lateralne dają co prawda możliwość półilościowej oceny stężenia badanego białka, ale ich zaletą jest ocena wyniku bez używania specjalistycznej aparatury, co może mieć duże znaczenie we wstępnej diagnostyce chorób nowotworowych. Tutaj również analizowano dwa warianty IgG/IgY i IgY/IgY. W obu

przypadkach uzyskano limit detekcji antygenów PSA i CA 15-3 pozwalający na odróżnienie próbek zawierających białko markerowe w stężeniu wyższym niż górna granica normy.

Należy zauważyć, że są to badania pracochłonne, wymagające opracowania odpowiednich warunków eksperymentu. Przedstawione wyniki badań świadczą o opanowaniu przez doktorantkę metodyki badawczej stosowanej w doświadczeniach i wskazują na Jej dużą wiedzę i umiejętności w tym zakresie.

Należy też wspomnieć, że już wcześniej podejmowano próby zastosowania ptasich immunoglobulin w diagnostyce chorób nowotworowych w oparciu o inne markery nowotworowe. Wyniki tych badań również wskazywały na możliwość zastosowania immunoglobulin IgY w diagnostyce.

Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera na 171 stronach wszystkie wymagane rozdziały i informacje. Wprowadzono także wykaz stosowanych skrótów oraz spis tabel i rycin. W pracy zamieszczono łącznie 65 rycin i 11 tabel.

Wybór publikacji będących podstawą formułowania celu badań świadczy o swobodnym poruszaniu się Doktorantki w tematyce.

W rozdziale Materiały i Metody dokładnie opisano modele badawcze, schematy doświadczeń oraz metodykę. Opis stosowanych metod jest bardzo dokładny i bogato ilustrowany schematami.

Wyniki badań stanowią ważny punkt wyjścia do dalszych badań oraz prób klinicznych. Nasuwa się więc pytanie, czy Doktorantka planuje kontynuację badań nad standaryzacją przygotowanych prototypów testów? Jakie ograniczenia widzi Doktorantka w zastosowaniu przygotowanych testów w diagnostyce?

Na wyróżnienie zasługuje również edytorska strona pracy. Dysertacja została przygotowana bardzo starannie, Doktorantka w jasny sposób przekazuje założenia pracy, wyniki i ich znaczenie w badaniach światowych i diagnostyce immunologicznej. Trudno też doszukać się większych uchybień edytorskich, poza nielicznymi literówkami. Dyskusja wyników prowadzona jest równoległe z ich prezentacją, co stanowi ciekawe przedstawienie zagadnienia. Czytanie pracy ułatwiają podsumowania wyników po każdym z etapów pracy.

Przedstawiona do oceny rozprawa jest oryginalnym, wartościowym i samodzielnym osiągnięciem Doktorantki. Wyniki prowadzonych badań wnoszą nowe istotne informacje do wiedzy dotyczącej możliwości wykorzystania przeciwciał wytworzonych w organizmie kury do wykrywania antygenów człowieka i ich potencjalnego zastosowania w diagnostyce chorób nowotworowych. Ważną część pracy stanowi rozdział Podsumowanie i wnioski, w którym

Doktorantka odnosi się wnikliwie do własnych osiągnięć, podkreślając innowacyjność przeprowadzonych badań. Doktorantka wykazała się również bardzo dobrą znajomością literatury przedmiotu.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja w pełni odpowiada wymaganiom ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki i składam do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Łapickiej-Słowik do dalszych etapów przewodu doktorskiego, na podstawie rozprawy, zatytułowanej: *Otrzymywanie przeciwciał IgY specyficznych wobec ludzkich markerów nowotworowych*.

Wnioskuje również o wyróżnienie rozprawy nagrodą. Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnego rozwiązywania postawionych zadań naukowych, znajomością i opanowaniem nowoczesnych technik laboratoryjnych, a sama rozprawa napisana została jasno i kompetentnie. Wyniki badań zostały już częściowo opublikowane, co podkreśla ich znaczenie w badaniach światowych. Stanowiły również podstawę do opracowania kilku patentów.

Warszawa, 21.12.2016r.



Prof. dr hab. Grażyna Korczak-Kowalska