



Dr hab. n. med. Michał Pikula
Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Lekarski, Katedra Immunologii
Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii
ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk, bud. nr 27
tel. 58 349 1592, fax. 58 349 1591
E-mail: pikula@gumed.edu.pl

Gdańsk, 02.01.2017

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr inż. Agnieszki Łupickiej-Słowik pt. „Otrzymywanie przeciwciał IgY specyficznych wobec ludzkich markerów nowotworowych”, napisanej pod kierunkiem Pana prof. dra hab. inż. Józefa Oleksyszyna. Recenzja opracowana na zlecenie Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej.

Z dużym zainteresowaniem zapoznałem się z pracą doktorską Pani mgr inż. Agnieszki Łupickiej-Słowik pt. „Otrzymywanie przeciwciał IgY specyficznych wobec ludzkich markerów nowotworowych”. Praca została zrealizowana w Zakładzie Chemii Medycznej i Mikrobiologii Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem Prof. dra hab. inż. Józefa Oleksyszyna. Praca dotyczy niezwykle istotnej i aktualnej kwestii metod wytwarzania antygenowo specyficznych przeciwciał. Przeciwciała stanowią bardzo ważną klasę związków biologicznie czynnych, które w organizmie człowieka, jak również zwierząt pełnią krytyczną rolę m.in. w tworzeniu odporności humoralnej. Przeciwciała od wielu lat wykorzystuje się również w medycynie i naukach pokrewnych na potrzeby diagnostyki oraz terapii szeregu chorób, głównie nowotworowych i zapalnych. W tym celu wykorzystywane są głównie przeciwciała wytwarzane przez komórki ssaków. Przeciwciała te, mimo wielu ugruntowanych zastosowań posiadają pewne wady i ograniczenia. Alternatywą do konwencjonalnych przeciwciał mogą być przeciwciała kurze IgY. Przeciwciała te mogą być stosunkowo łatwo izolowane z jaj kurzych, bez konieczności pobierania dużych ilości krwi od zwierząt i wywoływania dodatkowego stresu. Również technika uzyskiwania tego rodzaju przeciwciał jest tańsza od rutynowej procedury produkcji przeciwciał poliklonalnych, jak i monoklonalnych ssaków. Biorąc również pod uwagę właściwości biologiczne przeciwciał IgY, należy zauważyć ich ogromny potencjał praktyczny i duże możliwości zastosowania nie tylko diagnostycznego, ale również terapeutycznego. Przeciwciała IgY nie reagują krzyżowo z czynnikami reumatoidalnymi ani ludzkimi przeciwciałami anti-mysimi, które mogą

występować w ludzkim osoczu. Szczególnie przeciwciała anty-mysie (HAMA) stanowią problem dzisiejszej analityki medycznej. Mogą one bowiem silnie interferować z przeciwciałami diagnostycznymi wpływając znacząco na otrzymywane wyniki laboratoryjne. Przeciwciała IgY nie są również zdolne do aktywacji ludzkiego układu dopełniacza. Cieszy zatem podjęty przez Doktorantkę temat wytwarzania i badań biochemicznych przeciwciał IgY.

Recenzowaną pracę Pani mgr Agnieszki Łupickiej-Słowik stanowi przygotowane w języku polskim opracowanie liczące 171 stron. Praca podzielona jest na następujące części: wstęp (1), immunoglobuliny Y (2), markery nowotworowe (3), cele pracy (4), część eksperymentalna (5), podsumowanie i wnioski (6), materiały i metody (7), spis tabel (8), spis rysunków (9), wykaz skrótów (10), spis literatury (11). Na końcu pracy znajdują się również imponujący wykaz dorobku naukowego Doktorantki z wyszczególnieniem publikacji naukowych, patentów oraz doniesień konferencyjnych.

W pierwszych trzech rozdziałach Autorka opisała metody diagnostyki nowotworów oraz możliwości zastosowania przeciwciał w testach diagnostycznych chorób u ludzi. Autorka dokładnie opisała budowę i syntezę endogennych przeciwciał IgY u ptaków, otrzymywanie ich poprzez immunizację oraz właściwości biologiczne przeciwciał IgY. Doktorantka przedstawiła również możliwości zastosowania przeciwciał IgY w diagnostyce laboratoryjnej. W kolejnej części pracy zostały opisane wybrane do doświadczeń markery nowotworowe: antygen specyficzny dla prostaty (PSA), białko CA15-3 oraz deaminaza adenozy. Ta część pracy nie budzi zastrzeżeń Recenzenta. Opisanie markerów nowotworowych pozwala na pełne zapoznanie się z budową, syntezą i możliwościami ich zastosowania klinicznego. Warte podkreślenia są również bardzo dobrej jakości schematy budowy przeciwciał i markerów nowotworowych.

W rozdziale czwartym przedstawiono cele pracy, które zostały zdefiniowane jako otrzymanie poliklonalnych przeciwciał IgY specyficznych wobec ludzkich białek markerowych o potencjalnym zastosowaniu w diagnostyce onkologicznej. Autorka pracy postawiła za kolejny cel analizę biochemiczną otrzymanych przeciwciał. Cele pracy zostały postawione prawidłowo. Warto byłoby jednak w tym miejscu lub w osobnym rozdziale opisać bliżej założenia pracy oraz przesłanki, które zdecydowały o wykonaniu konkretnych typów doświadczeń.

Rozdział piąty, nazwany przez Doktorantkę „częścią eksperymentalną” zawiera głównie wyniki badań i stanowi zrab pracy. Rozdział ten podzielony jest na dwa podrozdziały: metodykę oraz badania własne. Podział ten, nie jest dla mnie w pełni

zrozumiały i wymaga wyjaśnienia przez Doktorantkę. Moim zdaniem, dla przejrzystości pracy, metodyka powinna zostać umieszczona w rozdziale materiały i metody. Metodyka opisywana w tym rozdziale została opisana jednak dokładnie i starannie. Doktorantka przedstawiła syntezę peptydów, immunizację zwierząt, izolację i charakterystykę przeciwciał IgY, testy immunoenzymatyczne oraz analizę SRP (powierzchniowy rezonans plazmowy). Bardzo wartościowe są w tej części pracy precyzyjne schematy, które pozwalają prześledzić daną technikę doświadczalną, np. schemat immobilizacji białek do powierzchni sensora. W tej części pracy warto byłoby dodać jaka była czystość otrzymywanych peptydów, przeznaczonych do immunizacji zwierząt. Jest to istotny element z uwagi na to, iż ewentualne dodatkowe związki, nawet w niewielkich ilościach, mogą wpływać na reakcję układu immunologicznego zwierząt. Dodatkowo, szerszego opisu wymagają kryteria wyboru konkretnych (immunogennych) epitopów białek markerowych do dalszej syntezy chemicznej (strona 48).

Doktorantka w drugim podrozdziale „badania własne” przedstawiła metodę otrzymywania przeciwciał poliklonalnych IgY specyficznych wobec białka PSA, CA15-3 oraz bydłczej deaminazy adenozy (cADA). Przedstawione zostały również właściwości biochemiczne otrzymanych przeciwciał IgY. Podrozdział ten stanowi bardzo wartościową część rozprawy doktorskiej i świadczy o dużym nakładzie pracy Doktorantki oraz dowodzi staranności wykonywanych doświadczeń. Wyniki przedstawione są zrozumiałe i są wsparte czytelnymi wykresami. Doktorantka wykazała, iż zaprezentowane techniki badawcze pozwalają na efektywne otrzymywanie poliklonalnych przeciwciał IgY specyficznych wobec właściwych (PSA, CA15-3) lub potencjalnych (cADA) markerów nowotworowych. Wykonane analizy biochemiczne uzyskanych przez Doktorantkę przeciwciał wykazały ich wysoką awidność oraz specyficzność wobec badanych antygenów. Warty podkreślenia jest również fakt, iż otrzymane przeciwciała zastosowano do konstrukcji immunoenzymatycznych oraz immunochromatograficznych prototypów testów diagnostycznych. Istotne jest, iż opracowany test ELISA oparty na przeciwciałach IgG/IgY zoptymalizowano do oznaczania antygeny specyficznego dla prostaty w próbkach surowicy pacjentów. Bardzo wartościowy jest również test na wykrywanie ludzkiej deaminazy adenozy (ADA). Większość aktualnie wykorzystywanych testów oznaczających ADA opiera się bowiem na jej aktywności enzymatycznej. Doktorantka w części eksperymentalnej pracy posługiwała się zaawansowanymi technikami badawczymi. Szczególnie warte podkreślenia jest wykorzystanie w pracy rezonansu plazmonów powierzchniowych, który pozwolił na analizę oddziaływań antygen-przeciwciała. Doświadczenia te zostały wykonane podczas stażu

Doktorantki w Laboratorium Peptydów oraz Chemii i Biologii Białek Uniwersytetu we Florencji.

Mimo imponujących wyników i dużej staranności w przygotowaniu omawianego podrozdziału, mam w tym miejscu kilka uwag. Moje wątpliwości budzi kwestia liczby powtórzeń przedstawianych doświadczeń. W zdecydowanej większości prezentują one średnią tylko z dwóch powtórzeń, np. wykresy na rysunkach 17-22. Ponadto, Doktorantka nie wyjaśniła czy dotyczą one powtórzeń biologicznych (niezależne doświadczenia immunizacji zwierząt), czy też były to tzw. powtórzenia techniczne. Brakuje również informacji na temat liczby zwierząt wykorzystanych do doświadczeń. Dodatkowo, przy omawianiu wyników oczyszczania przeciwciał IgY anty CA15-3 Doktorantka nie wyjaśniła czym były kontrole K3 oraz K4 (rysunek 47). W przypadku rysunku nr 50 (detekcja białka MUC1 na komórkach MCF-7) warto byłoby dodać również zdjęcie komórek w świetle widzialnym, co uwidocznilyby ilość komórek wykazujących ekspresję MUC1. Natomiast do uwidocznienia topografii ekspresji MUC1 w komórkach MCF-7 należałoby wykonać również barwienia jąder komórkowych, np. barwnikiem DAPI. Chciałbym podkreślić, iż mimo tych uwag, całość rozdziału „część eksperymentalna” reprezentuje bardzo wysoki poziom naukowy i stanowi niezwykle wartościową podstawę do wyciągania wniosków.

W następnym rozdziale „podsumowanie i wnioski” znajduje się wyszczególnienie i opisanie najważniejszych wyników pracy. Opis ten nie budzi większych zastrzeżeń Recenzenta i świadczy o wysokich umiejętnościach syntezy otrzymywanych wyników. W omawianym rozdziale brakuje moim zdaniem szerszej dyskusji wyników, np. przyczyn różnej reaktywności przeciwciał IgY w zależności od stosowanego peptydu, jak również odniesienia się do częstości wyników fałszywie dodatnich otrzymywanych w przypadku zastosowania ssaczych przeciwciał oraz możliwości wystąpienia takiego zjawiska w przypadku IgY. Warto byłoby również omówić krótko interpretację wyników z zastosowaną linią komórkową MCF-7. Do jakiego stopnia można odnieść ją do komórek nowotworowych izolowanych rutynowo od pacjentek? W mojej opinii warto byłoby przedstawić także bardziej ogólne wnioski płynące z prac eksperymentalnych i podsumowania wyników. Szczególnie ciekawą kwestią są potencjalne możliwości zastosowania terapeutycznego przeciwciał IgY.

Rozdział siódmy „materiały i metody” zawiera dokładne opisy przygotowania antygenów peptydowych do immunizacji zwierząt, procedurę immunizacji, izolacji oraz badania właściwości biochemicznych otrzymywanych przeciwciał. Warte podkreślenia są dokładne opisy testów ELISA z wykorzystaniem uzyskanych przeciwciał IgY. W podrozdziale 7.2 należałoby wskazać pełną liczbę zwierząt, które posłużyły do immunizacji

oraz realizacji pracy doktorskiej. Prosiłbym również o wyjaśnienie do jakich doświadczeń stosowano 2 zwierzęta w grupie a dla jakich 4 zwierzęta w grupie (strona 129).

Spis tabel, rysunków oraz wykaz skrótów przygotowane są w sposób staranny i nie budzą zastrzeżeń Recenzenta. W pracy przedstawiono łącznie 11 tabel oraz 65 rysunków, które wyróżniały się bardzo dobrą jakością.

Dobór piśmiennictwa liczącego 212 pozycji bibliograficznych przygotowany był starannie i nie budzi zastrzeżeń. Cytowana literatura znajduje się również na końcu odpowiednich stron pracy doktorskiej, co w znaczny sposób ułatwia zaznajomienie się z informacją na temat publikacji. Wykorzystanie bogatej i szerokiej literatury pokazuje, iż Autorka rozprawy swobodnie porusza się w zakresie prowadzonych badań naukowych. Należy jednak zaznaczyć, iż znaczna część cytowanych prac została opublikowana ponad 10 lat temu.

Doktorantka przedstawiła na końcu pracy również swój dorobek naukowy, w skład którego wchodzi: 7 publikacji naukowych (większość o zasięgu międzynarodowym), 16 patentów, 2 zgłoszenia patentowe oraz 5 doniesień konferencyjnych. Co ważne, większość prac oraz patentów związana jest tematyką recenzowanej pracy doktorskiej. Warty podkreślenia jest również fakt, iż w dwóch publikacjach Doktorantka jest pierwszym Autorem. Wyszczególnione prace zostały opublikowane w latach 2011-2015. Doktorantka brała również udział w realizacji kilku projektów naukowych, w tym w jednym z nich, jako kierownik projektu (realizacja w latach 2015-2017, konkurs NCN Preludium 7). Wszystko to świadczy o dużej aktywności naukowej Doktorantki oraz ukierunkowaniu na praktyczne zastosowanie wyników prac.

Cała praca napisana jest bardzo starannie i reprezentuje wysoki poziom edytorski. Mimo to, Doktorantka w kilku miejscach pracy popełniła niewielkie błędy lub zastosowała niefortunne zwroty pisząc np. „gikozylotransferaz” (strona 34) lub „ocena zjadliwości” nowotworu (strona 37) zamiast „ocena złośliwości”. Chciałbym również zwrócić uwagę, na pojawiającą się w wielu miejscach pracy nazwę „cielęca deaminaza”. Zgodnie z nazewnictwem biologicznym bardziej właściwym jest stosowanie nazwy bydlęca deaminaza. Również szeroko przyjętą nazwą dla tego enzymu jest „deaminaza adenozyne” zamiast stosowanej w pracy „deaminazy adenozykowej”. Omyłki te nie wpływają jednak na ogólny obraz pracy i przy tak wysokim poziomie rozprawy doktorskiej nie mają dużego znaczenia.

Podsumowując, chciałbym podkreślić wysoki poziom naukowy recenzowanej rozprawy doktorskiej, a szczególnie poruszenie ciekawego problemu naukowego, precyzyjnie wykonane i opisane doświadczenia oraz wysoce aplikacyjny charakter pracy. Jednocześnie

chciałbym podkreślić, iż Autorka włożyła ogromny wkład pracy laboratoryjnej by uzyskać zaprezentowane wyniki. Co ważne, większość z tych wyników spotkało się z dużym zainteresowaniem i dobrym przyjęciem przez świat naukowy, czego dowodem są publikacje o zasięgu międzynarodowym. Żywię nadzieję, że badania Doktorantki oraz Zespołu Zakładu spotkają się z jeszcze większym zainteresowaniem środowiska naukowego oraz przemysłu biotechnologicznego oraz farmaceutycznego. Z pewnością zagadnienie możliwości wykorzystywania przeciwciał IgY w medycynie i naukach pokrewnych jest jeszcze słabo poznane i powinno być szerzej propagowane.

Podsumowując stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Łupickiej-Słowik pt. „Otrzymywanie przeciwciał IgY specyficznych wobec ludzkich markerów nowotworowych” odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku, jak również spełnia zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z tym, wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Łupickiej-Słowik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na wysoki poziom naukowy pracy, wysoki dorobek naukowy Autorki oraz duże możliwości praktycznego zastosowania wyników pracy wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Łupickiej-Słowik.



Dr hab. n. med. Michał Piłkuła