

dr hab. Aneta Rogalska, prof. UŁ
Katedra Biofizyki Medycznej,
Instytut Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź

Łódź, 15 lipca 2021 r

Ocena

rozprawy doktorskiej Pana mgr. Michała Kopczyńskiego
pt: *„Aktywność cytotoksyczna oraz mechanizm nabywania oporności
na AD-O51.4, białko fuzyjne TRAIL-peptyd VEGFA, w modelach raka jelita
grubego.”*

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Genetyki Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie pod kierunkiem Pana dr hab. n med. Michała Mikuli. Praca jest usytuowana w obszarze badań dotyczącym poszukiwania nowych strategii przezwycięzania oporności w raku jelita grubego. Praca dotyczy analizy aktywności cytotoksycznej nowej pochodnej TRAIL, białka AD-051.4 oraz wyjaśnienia mechanizmów powstawania oporności w raku jelita grubego z wykorzystaniem modelu *in vitro* i *in vivo*. Temat jest jak najbardziej aktualny i niezwykle ciekawy. Badania kliniczne z zastosowaniem rekombinowanego ludzkiego ligandu TRAIL jak i agonistów receptora TRAIL w licznych nowotworach wykazały korzystny efekt terapeutyczny, czego podstawę upatruje się w zdolności do selektywnej indukcji apoptozy komórek nowotworowych bez wywoływania efektu cytotoksycznego w komórkach prawidłowych. Mimo to znaczny odsetek komórek nowotworowych nie jest wrażliwy na działanie TRAIL. Obecnie większość badań ma na celu pokonanie oporności komórek nowotworowych na apoptozę indukowaną TRAIL. Jedną z najsukuteczniejszych form leczenia jest chemioterapia skojarzona. Praca Pana Michała Kopczyńskiego jak najbardziej wpisuje się w ten nurt.

Rozprawa ma typowy układ, zgodny z wymogami stawianymi pracom doktorskim. Napisana jest w formie liczącego 75 stron manuskryptu i składa się z rozdziałów, takich jak: *wykaz skrótów i symboli, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo*. Ponadto rozprawa zawiera 30 rycin i 2 tabele. Całość uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim. Praca napisana jest zwięźle i rzeczowo, poprawnym językiem, więc czyta się ją bardzo dobrze.

Wstęp doskonale wprowadza w temat dysertacji. Doktorant omawia mechanizmy kontrolne cyklu komórkowego wskazując na potencjalne zagrożenia wynikające z zaburzeń tychże mechanizmów w postaci nowotworzenia czy starzenia się. Omówione zostały także endogenne przyczyny mutagenezy w postaci błędów replikacji czy uszkodzeń DNA oraz etapy procesu nowotworzenia. Szczególna uwaga została poświęcona modelowi genetycznemu nowotworzenia raka jelita grubego, stosowanej terapii zależnej od klinicznej oceny stopnia zaawansowania nowotworu. Przytoczone przez doktoranta dane dotyczące częstości występowania raka jelita grubego są niepokojące, zwłaszcza, że we wczesnych etapach może on przebiegać bezobjawowo. Rozpoznanie tego typu nowotworu jest kwestią przypadkowych badań lub badań przesiewowych, co dowodzi, że podjęty w dysertacji problem jest niezwykle ważny nie tylko z poznawczego punktu widzenia, ale w szczególności z uwagi na potencjalne zastosowanie praktyczne. Już na tym etapie pracy mgr Kopczyński odnosi się do stosowanych schematów lekowych i wskazuje na płynące z nich korzyści dla pacjenta. Dużą część wstępu Doktorant poświęcił szczegółowemu omówieniu podstawowych mechanizmów śmierci komórkowej zwłaszcza wewnętrznej i zewnętrznej ścieżce apoptozy, w zainicjowaniu której biorą udział komórki immunokompetentne, w tym ligandy rodziny czynnika martwicy nowotworu do których należy białko TRAIL. We wstępie zastosowano schematy ilustrujące budowę błonowych receptorów TRAIL jak i przedstawiono szlaki sygnałowe kinaz prowadzących do przeżycia komórki co pozwoliło wyjaśnić cele pracy i uzasadnić wybór badanych parametrów. Co ważne Doktorant zwrócił również uwagę na zjawisko oporności wielolekowej towarzyszącej m.in. przeciwciałom monoklonalnym opartym na TRAIL jak i na wynikające z badań dotychczas podjęte sposoby przełamania zjawiska oporności. Doktorant jednocześnie przedstawił swoje rozwiązanie problemu naukowego w postaci fuzyjnego białka powstałego z połączenia ligandu TRAIL z peptydem pochodzącym z czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego VEGF.

Podsumowując wstęp pracy jest spójny i świadczy o wysokiej wiedzy Doktoranta w tematyce badanych zagadnień.

Doktorant za **cel pracy** postawił sobie analizę aktywności cytotoksycznej oraz poznanie mechanizmu powstawania oporności na AD-051.4 w raku jelita grubego.

Rozdział **materiały i metody** został podzielony na badania *in vitro* i *in vivo*. Model *in vitro* obejmował 9 ludzkich linii komórkowych raka jelita grubego i 3 linie mysie. Zgodnie z wymogami dla badań z udziałem zwierząt, w dysertacji znajduje się informacja o stosownej zgodzie Lokalnej Komisji Bioetycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie, jak i informacja, że pacjenci wyrazili zgodę na wykorzystanie pobranych materiałów do celów naukowych. Doktorant zastosował kilka nowoczesnych metod biologii molekularnej do oznaczenia badanych parametrów, w tym test MTT do oceny żywotności komórek, metodę immunofluorescencyjną z zastosowaniem przeciwciał do pomiaru ilościowego receptorów TRAIL, jak i oznaczył poziom 43 markerów apoptotycznych za pomocą mikromacierzy białkowej, w oparciu o analizę densymetryczną. Ponadto Doktorant do części *in vivo* metodyki pracy zastosował i dokładnie opisał tworzenie i propagację ksenograftów z nowotworów ludzkich jak i tworzenie heteroprzeszczepów w oparciu o linie komórkowe. W tej części dysertacji Doktorant opisał również metodykę pomiarów wielkości guza, jak i podawania badanych związków.

Rozdział **wyniki** jest przygotowany przejrzysto, z dobrze dobranymi wykresami i tabelami ilustrującymi otrzymane wyniki. Wyniki nie pozostawiają wątpliwości, które z określonych różnic są istotne statystycznie. Za cenne uważam porównanie działania białka fuzyjnego *in vitro* i *in vivo*, wskazujące na modulujący udział peptydu pochodzącego z VEGFA, co widoczne było zwłaszcza w kserografach pochodzących z linii CACO-2. Doktorant uzyskał również ważne z punktu widzenia klinicznego wyniki wskazujące, że po działaniu AD-051.4 w czterech modelach PDX doszło do istotnego statystycznie zmniejszenia objętości guza a w kolejnym do jego zahamowania i jednocześnie nie zaobserwowano żadnych skutków ubocznych na organizm myszy. Doktorant zmierzył się również w swoich badaniach z niełatwym zadaniem wyprowadzenia dwóch linii opornych na stosowane białko fuzyjne oraz białko TRAIL. Nie znalazłam natomiast informacji, ile czasu zajęło Doktorantowi uzyskanie linii opornych. Takie dane są cenne dla naukowców, którzy będą chcieli powtórzyć eksperyment, zwłaszcza że mgr Kopczyński opublikował swoje wyniki w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. W dysertacji podjęto również próbę wyjaśnienia mechanizmu leżącego

u podłoża cytotoksyczności badanego białka. W tym celu wykonano czasochłonne i wymagające metody molekularne, jak barwienie immunofluorescencyjne z jednoczesną analizą przy zastosowaniu mikroskopu konfokalnego, jak również podjęto próbę prześledzenia poziomu białek apoptotycznych z wykorzystaniem mikromacierzy białkowej.

W kolejnym rozdziale pojawia się bardzo dobrze przeprowadzona i przemyślana **dyskusja**. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant do swoich badań podchodzi krytycznie, zwraca uwagę na pewne słabe strony podjętych badań, co świadczy o dojrzałym podejściu do wnioskowania. Na podkreślenie zasługuje rycina nr 30, która stanowi schemat zewnątrz i wewnątrzpochodnego mechanizmu nabywania oporności na AD-051.4 oparty o uzyskane wyniki. Ostatecznie Doktorant w rozdziale 9 przedstawia dobrze skonstruowany wniosek ze swoich badań, który moim zdaniem znakomicie podkreśla wagę badań podjętych przez Doktoranta i wskazuje na możliwość wykorzystania poczynionych obserwacji dotyczących cytotoksyczności i mechanizmu działania AD-051.4 w terapii raka jelita grubego. Doktorant logicznie wiąże swoje obserwacje z piśmiennictwem. Autor wykazał się w pracy bardzo dobrą znajomością poruszanej tematyki. Powołuje się On na 282 pozycje literaturowe, ułożone w kolejności pojawiania się w tekście. W większości są to oryginalne prace anglojęzyczne, opublikowane w czasopismach o wysokim IF.

Autor nie ustrzegł się pewnych błędów, które jednak nie wpływają na moją bardzo dobrą ocenę merytoryczną pracy. W pracy moim zdaniem powinno znaleźć się więcej informacji na temat budowy chemicznej białka AD-051.4. W rozdziale 6.5.2. można było wymienić zastosowane modele PDX, jak i użyte linie komórkowe, co ułatwiłoby śledzenie toku badań. Dane te znalazły się w sekcji Wyniki. Badania mgr. Kopczyńskiego wykazały spadek poziomu receptorów R1 i R2 w liniach opornych z wykorzystaniem barwienia immunofluorescencyjnego. Wyniki uzyskane po zastosowaniu mikromacierzy nie potwierdziły spadku poziomu ilości receptorów R1 i R2, ale zaobserwowano wzrost receptorów DcR1 i DcR2. Czy Doktorant mógłby wyjaśnić te różnice w uzyskanych wynikach. Z obowiązku recenzenta chciałabym również zwrócić uwagę na kilka zauważonych nieścisłości, co być może w przyszłości pozwoli Doktorantowi ich uniknąć. Doktorant nie wyjaśniał w większości przypadków skrótów przy pierwszym użyciu w tekście. Są one wyjaśnione jedynie w wykazie skrótów i symboli na stronie 6. Przy kilku pozycjach literaturowych w rozdziale piśmiennictwo, brakuje pełnych danych bibliograficznych.

Wniosek końcowy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Michała Kopczyńskiego pt: „*Aktywność cytotoksyczna oraz mechanizm nabywania oporności na AD-051.4, białko fuzyjne TRAIL-peptyd VEGFA, w modelach raka jelita grubego*” ma dużą wartość poznawczą i niewątpliwie wzbogaca naszą wiedzę na temat mechanizmu działania AD-051.4 jak i na temat powstawania oporności na cząsteczkę AD-051.4 w raku jelita grubego. Praca zawiera elementy nowości naukowej, a także dowodzi umiejętności Doktoranta w zakresie planowania i przeprowadzenia badań naukowych oraz interpretacji uzyskanych wyników. Doktorant wykazał się także bardzo dobrą znajomością literatury przedmiotu. Praca ma dużą wartość poznawczą i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tej dziedzinie.

Stwierdzam, że praca spełnia wszystkie warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U2003 nr 65, poz 595 z późn.zm.).

Z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr. Michała Kopczyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. W uzasadnieniu pragnę podkreślić, że wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej zostały już opublikowane w *International Journal of Molecular Sciences*, czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania (IF = 5,923), znajdującym się na liście JCR oraz na liście czasopism punktowanych MNiSW (liczba punktów 140 pkt). Dodatkowo za wyróżnieniem przemawia aplikacyjny charakter badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej.

załączam wyrazy szacunku

Aneta Rogalska

dr hab. Aneta Rogalska, prof. UŁ