



Warszawa, 26.07.2021

**Recenzja 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”,
wykonanej pod kierunkiem Promotora, Pana dr. hab. n. med. Michała Mikuli.**

Rozprawa doktorska mgr. Michała Kopczyńskiego dotyczy preklinicznych badań nad skutecznością nowego potencjalnego leku przeciwnowotworowego w leczeniu raka jelita grubego. W rozprawie Doktorant skupił się na analizie związku o znanego pod nazwą AD-O51.4, będącego białkiem fuzyjnym cząsteczek TRAIL i VEGFA. Zaawansowany rak jelita grubego jest niestety wciąż chorobą nieuleczalną, a chorzy poddani leczeniu systemowemu z zastosowaniem najnowszych terapii celowanych podlegają jedynie czasowej remisji. W związku z tym, tematyka rozprawy doktorskiej mgr. Michała Kopczyńskiego niewątpliwie dotyka problemu ważnego zarówno z punktu widzenia klinicznego jak i społecznego.

Ocena formalna rozprawy:

Rozprawa ma układ typowy i składa się z 75. ponumerowanych stron, obejmujących główne rozdziały (Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Bibliografia), 30 ponumerowanych rycin i dwie tabele. Rozbudowany spis piśmiennictwa (228 pozycji) obejmuje znaczący odsetek prac opublikowanych po 2010 roku (82 pozycje), co wskazuje na to, że Autor śledzi postęp badań związanych z tematyką rozprawy.

Rozprawa jest napisana poprawnym językiem, z unikaniem kolokwializmów i slangu laboratoryjnego. Stosunkowo nieliczne błędy literowe i interpunkcyjne (np. „badanych” zamiast „badaniach”- str. 9, 8 wiersz od dołu; zbędny nawias po słowach „Model 1420-012” na str. 30, 12 wiersz od dołu; brak litery „b” w nazwie „Human Apoptosis Antiody Array” na stronach 33, 50-53; ; brak spacji po „(±2°C)” – str. 35, pierwszy wiersz od góry; „terapeutyczne” zamiast „terapeutyczny”- str. 54, 16 wiersz od dołu; „działanie” zamiast „działania”-str. 56, 4 wiersz od dołu; zbędna kropka na str. 57, 15 wiersz od góry) są nie do uniknięcia w tego typu opracowaniach. Uwagę recenzenta zwróciło jednak niewłaściwe sformułowanie: „(...) jedną z najbardziej fundamentalnych decyzji, które komórka nieustannie podejmuje (...)” (str. 11, wiersz 4-5 od góry) sugerujące, że komórka jest bytem osobowym, który może podejmować jakieś decyzje.

Wstęp, jakkolwiek interesujący, jest w mojej ocenie zbyt rozbudowany (obejmuje 27 z 75 stron rozprawy). Autor szeroko opisuje m.in. molekularne mechanizmy kontrolujące proliferację i stan spoczynkowy komórki oraz molekularne podłoże procesu nowotworzenia, czyli informacje o bardzo ogólnym i podstawowym charakterze, które według mnie można było lub potraktować bardziej skrótowo. Pozostałe podrozdziały Wstępu, obejmujące model genetyczny raka jelita grubego, praktykę kliniczną w leczeniu tej chorób, opis szlaków śmierci komórkowej stanowią dobre wprowadzenie do tematyki rozprawy. Za szczególnie cenne uważam podrozdziały opisujące cząsteczkę TRAIL i jej zastosowanie w badaniach klinicznych. We Wstępie (i całej rozprawie) zabrakło jednak bardziej rozbudowanego opisu cząsteczki stanowiącej przedmiot prowadzonych badań, czyli AD-O51.4. Poświęcono jej niecałe 7 wierszy na stronie 27 Wstępu. Jest to tym bardziej zaskakujące, że Doktorant zna i cytuje pracę, w której dokładnie opisano zarówno strukturę jak i właściwości fuzyjnej cząsteczki AD-O51.4 (Rozga P i wsp. *Int J Cancer*. 2020 Aug 15;147(4):1117-1130.). Informacje te byłyby bardzo przydatne dla czytelników rozprawy, w szczególności w celu zrozumienia i interpretacji wyników uzyskanych przez Doktoranta.



Ocena merytoryczna rozprawy:

Celem pracy była „analiza aktywności cytotoksycznej oraz mechanizmu powstawania oporności na nową cząsteczkę AD-O51.4 firmy ADAMED z wykorzystaniem modeli *in vitro* oraz *in vivo* raka jelita grubego”. Posługując się szerokim zakresem metod, obejmującym techniki biologii molekularnej i komórkowej, a także badania *in vivo* w modelu zwierzęcym, Doktorant wykazał wrażliwość kilku linii komórkowych wywodzących się z raka jelita grubego człowieka na pochodną TRAIL AD-O51.4. Prowadzone na myszach badania *in vivo*, z wykorzystaniem zarówno linii komórkowych jak przeszczepianych fragmentów nowotworów pobranych od pacjentów, również potwierdziły potencjał antynowotworowy testowanej cząsteczki, przy równoczesnym braku niepożądanych działań ubocznych u zwierząt. Doktorant wykazał też istnienie związku między poziomem ekspresji receptorów TRAIL na powierzchni komórki a wrażliwością na AD-O51.4. Porównując zachodzące w trakcie nabywania oporności na AD-O51.4 zmiany w poziomie wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej ekspresji receptorów TRAIL, Doktorant wskazał, że u podłoża mechanizmu oporności mogą leżeć zmiany w lokalizacji receptorów. Doprowadziło to do sformułowania sugestii, że markerem oporności raka jelita grubego na terapię pochodnymi TRAIL może być stosunek między ilością receptorów propaoptotycznych (R1 i R2), a antyapoptotycznych (DcR1 i DcR2). Odkrycie to, choć niewątpliwie wymagające walidacji, może w przyszłości stać się skutecznym narzędziem pozwalającym na selekcję grupy pacjentów najlepiej rokujących w leczeniu takimi preparatami. Doktorant przeprowadził również analizę ilości 43 białek związanych z apoptozą w liniach komórkowych wrażliwych i opornych na AD-O51.4 i na podstawie uzyskanych wyników zaproponował rozbudowany mechanizm molekularny nabytej oporności na AD-O51.4.

Na szczególne podkreślenie zasługuje szeroki zakres umiejętności eksperymentalnych mgr. Michała Kopczyńskiego, obejmujący zarówno techniki biologii molekularnej i komórkowej, jak i prowadzenie badań *in vivo* na myszach. Taka różnorodność eksperymentalna jest na ogół efektem pracy całego zespołu specjalistów. W swojej rozprawie Doktorant udowodnił, że równie sprawnie posługuje się tak różnymi narzędziami, jak pipeta, mikroskop czy skalpel. Uzyskane wyniki zostały poddane skrupulatnej analizie statystycznej z zastosowaniem odpowiednich testów.

W trakcie czytania tej interesującej rozprawy nasunęło mi się kilka pytań. Prosiłabym, by Doktorant odniósł się do nich w trakcie obrony:

- 1) W opisie Materiałów i Metod zabrakło informacji o źródle cząsteczki AD-O51.4. Czy była ona zakupiona, czy ofiarowana przez firmę ADAMED? Czy praca była wykonana we współpracy z tą firmą? Te informacje są istotne z punktu widzenia potencjalnego konfliktu interesów.
- 2) Kluczowym elementem badań w naukach eksperymentalnych jest walidacja wyników. Czy podjęto próbę walidacji wyników uzyskanych za pomocą macierzy z nadrukowanymi przeciwciałami (Human Apoptosis Antibody Array)?
- 3) Czy zdaniem Autora, postulowany mechanizm oporności komórek raka jelita grubego na AD-O51.4 (Rysunek 30) może leżeć też u podłoża oporności na cząsteczkę wyjściową (TRAIL)? Innymi słowy, czy jest to mechanizm uniwersalny, czy ograniczony wyłącznie do AD-O51.4?
- 4) Str. 39. „Wykazano znamienne silniejszy efekt działania AD-O51.4 niż natywnego białka TRAIL, co może wskazywać na modulujący udział peptydu pochodzącego z VEGFA z rekombinowanego białka AD-O51.4 w indukcji jego aktywności przeciwnowotworowej *in vivo*”. Str. 57: „Prawdopodobnie powodem różnic w cytotoksycznym działaniu AD-O51.4 jest peptyd hamujący czynnik VEGFA, o który wzbogacone jest białko fuzyjne AD-O51.4”. Jaki może to być mechanizm? Czy zaobserwowane *in vivo*



efekty działania badanej cząsteczki mogą dotyczyć wpływu na angiogenezę? Jeśli tak, to w jakim mechanizmie?

- 5) Str. 48: „Być może źródłem oporności linii RKO nie jest gęstość receptorów TRAIL, a ma ono raczej pochodzenie wewnątrzkomórkowe” (podobne stwierdzenie pada na str. 58) – jaki może być mechanizm tej oporności?

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr. Michała Kopczyńskiego oceniam wysoko. Oceny tej nie pomniejszają wspomniane wyżej nieliczne uwagi krytyczne. Doktorant postawił sobie jasno sprecyzowany cel, który zrealizował przeprowadzając prawidłowo zaplanowane eksperymenty wykonane za pomocą szerokiego spektrum różnorodnych technik biologii molekularnej, komórkowej oraz badań in vivo. Uzyskane wyniki poddał rygorystycznej analizie statystycznej i przeprowadził prawidłowe wnioski, stwierdzając, że „białko fuzyjne AD-O51.4. wykazuje właściwości skutecznej, specyficznej oraz bezpiecznej terapii przeciwnowotworowej i mogłoby być przekazane do badań klinicznych”. Na podstawie uzyskanych wyników, Doktorant zasugerował również możliwy mechanizm nabywania oporności komórek nowotworowych na AD-O51.4. Na podkreślenie zasługują wybitnie kliniczne implikacje ocenianej rozprawy, stanowiące punkt wyjścia do dalszych badań przedklinicznych i klinicznych. Tym samym stwierdzam, że **rozprawa doktorska mgr. Michała Kopczyńskiego spełnia wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. poz. 1668) i wnioskuję do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy.**

Kierownik Zakładu Biochemii i Biologii Molek.
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego

prof. dr hab. n. med. Agnieszka Piekietko-Witki