



Warszawa, 15 lipca 2021 r.

Szanowny Pan
prof. dr hab. Andrzej Kozik
Przewodniczący Rady Dyscypliny Nauki biologiczne
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR. DAMIANA KLÓSKI
ZATYTUŁOWANEJ: "MOLEKULARNY MECHANIZM AKTYWNOŚCI
PRZECIWNOWOTWOROWEJ ZMODYFIKOWANEGO BIAŁKA TRAIL W
EKSPERYMENTALNEJ TERAPII CELOWANEJ"

Od lat toczą się badania nad rozwojem celowanych terapii przeciwnowotworowych, które gwarantowałyby selektywne niszczenie komórek nowotworowych bez uszkodzenia prawidłowych komórek człowieka. I choć tego rodzaju wybiórczość działania jest w układach biologicznych bardzo trudna, żeby nie powiedzieć, że niemożliwa do osiągnięcia, znane są spektakularne przykłady leków, które ze śmiertelnej choroby nowotworowej uczyniły chorobę przewlekłą, nie skracającą lub skracającą w niewielkim stopniu czas życia chorych. Taki postęp dokonał się chociażby w leczeniu chorych na przewlekłą białaczkę szpikową (PBSz), w której molekularnym „motorem” rozwoju nowotworu jest zrównoważona translokacja między chromosomami 22 i 9, prowadząca do wytworzenia genu fuzyjnego *BCR-ABL* kodującego „wszechstronny” onkogen. Wprowadzenie w 2001 roku do leczenia chorych na PBSz inhibitora aktywności kinazowej białka p210 – imatynibu pozostaje do dziś jednym z największych sukcesów onkologii. Podobnych, choć mniej spektakularnych, postępów można dopatrzeć się w terapii wielu innych nowotworów (w raku piersi – opracowanie inhibitorów/blokerów białka HER2, w raku płuca – wprowadzenie do leczenia inhibitorów kinazy ALK czy blokerów receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu). W tym miejscu nie sposób nie dokonać dość

smutnej konkluzji, że, poza pojedynczymi wyjątkami, terapia celowana molekularnie wcześniej czy później przestaje być skuteczna, gdyż mikroewolucja guza nowotworowego prowadzi do selekcji klonów komórek nowotworowych, które utraciły wrażliwość na dany lek.

Bez wątplenia tematyka przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej pana mgr. Damiana Klóski wpisuje się zatem w jeden z wiodących trendów badań we współczesnej onkologii, którym jest opracowywanie nowych terapii celowanych. W swoich badaniach Doktorant podjął próbę wyjaśnienia molekularnego mechanizmu działania potencjalnego kandydata na lek – cząsteczki AD-O51.4, będącej fuzantem należącego do nadrodziny czynnika martwicy nowotworu białka TRAIL i peptydu pochodzącego z czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF). Konstrukcja składowych tej cząsteczki sugeruje zaangażowanie jej w regulację procesów apoptozy i angiogenezy. Zasadność takiego podejścia podczas konstruowania nowych leków to temat na osobną dyskusję, wykraczającą poza zakres niniejszej recenzji.

Rozprawa ma klasyczny układ i została przygotowana zgodnie z przyjętymi standardami dla tego rodzaju dysertacji. Nie jestem jednak zwolennikiem umieszczania wniosków w rozdziale „Wyniki”, przed krytyczną dyskusją uzyskanych danych.

We wstępie Doktorant zwięźle podsumował podstawowe wiadomości na temat apoptozy i dróg jej indukcji w komórkach ssaczych, opisał białko TRAIL, dla niego receptory oraz, co uważam za najlepszą część całego wstępu, znane mechanizmy oporności komórek na proapoptotyczne działanie białka TRAIL. Ponadto, przedstawił bardzo skrótowo zagadnienie angiogenezy nowotworowej, głównie skupiając się na działaniu czynnika wzrostu śródbłonna naczyń. Wysoko oceniam też niełatwy do syntetycznego podsumowania opis dotychczasowych terapeutycznych zastosowań białka TRAIL oraz terapii antyangiogennych. Taki wybór zagadnień jest jak najbardziej zrozumiały, mając na względzie budowę i składowe testowanej w dalszej części pracy cząsteczki AD-O51.4. Z obowiązku Recenzenta muszę zwrócić uwagę na dość częste użycie przez Doktoranta nie do końca poprawnej, kolokwialnej terminologii. Dla przykładu: skutki uboczne (prawidłowo: działania niepożądane), efekt (skutek, działanie), zdolność do przerzutów (zdolność do tworzenia przerzutów, zdolność do przerzutowania), zaburzenia autoimmunologiczne (zaburzenia autoimmunizacyjne) czy stan zapalny (zapalenie). Nie mogę też zgodzić się ze

stwierdzeniem, że „wspólnym pożądanym efektem [terapii celowanej] jest apoptoza komórek nowotworowych”.

Doktorant w ramach celu głównego zdefiniował pięć celów szczegółowych, które zdeterminowały zakres przeprowadzonych badań. Cele te zostały jasno określone, a wykonane doświadczenia i uzyskane wyniki umożliwiły ich realizację.

Rozdział „Materiały i metody” został przygotowany prawidłowo, zawiera opis wszystkich zastosowanych metod. Na podkreślenie zasługuje wyjątkowo bogata i nowoczesna metodyka pracy – bez wątplenia jest to zasługa Opiekuna pracy oraz tego, w jak znakomitym Zespole prowadzone były przez Doktoranta jego badania.

Zdaję sobie z tego sprawę, jak niełatwe jest tłumaczenie terminologii angielskiej na język polski. Często, gdy zbyt dosłowne, prowadzi do lapsusów językowych, jak „bezwłose myszy immunodefektywne SCID” (poprawna nazwa to: bezwłose myszy z ciężkim złożonym niedoborem odporności) czy „poziom białka”. Generalnie, w naszych doświadczeniach **badamy** dane zjawisko a nie dokonujemy, jak w szkole, jego „oceny”. W podrozdziale 3.11 („Analiza aktywacji kaspazy 3 i ciętego białka PARP”), na rycinie 13 zabrakło opisu, które z badanych białek było wykrywane w cytometrii przepływowej za pomocą przeciwciał skoniugowanych z APC, a które z PE.

Rozdział „Wyniki” jest zwięzły. Przedstawia wyniki przeprowadzonych badań z ich krótkim podsumowaniem. Wyniki przedstawione zostały klarownie, w etapach uzasadnionych logiczną kolejnością wykonywanych badań, a ilustrujące je ryciny poprawnie zacytowano w tekście. Bez wątplenia zasadnym było rozpoczęcie omawiania uzyskanych wyników od danych z doświadczeń w modelu mysim (zbadanie działania przeciwnowotworowego cząsteczki AD-O51.4 w modelu ksenoprzeszczepienia komórek nowotworowych ludzkich ustalonych linii komórkowych do myszy z ciężkim złożonym niedoborem odporności). Następnie Doktorant wykonał liczne doświadczenia w modelach *in vitro*. Nie mam większych zastrzeżeń do tej części rozprawy, jedynie drobne uwagi:

- Szkoda, że zawarte w pracy zdjęcia dokumentujące doświadczenia z wykorzystaniem metod obrazowych są tak małych rozmiarów – nie pozwalają one na ich dokładną analizę.
- W badaniach z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym sugerowałabym uwzględnienie więcej niż jednego genu referencyjnego.
- Pod ryciną 18 znajduje się niewłaściwy opis grup.

- Jakie Doktorant znajduje wytłumaczenie dla zwiększenia „żywności”, a w zasadzie zwiększenia metabolizmu MTT, w komórkach HAEC pod wpływem inkubacji z AD-O51.4 czy TRAIL (rycina 25)?
- W wynikach opisanych w podrozdziale 4.4 zabrakło mi danych dla kontroli pozytywnej (rycina 32).
- Dlaczego na rycinie 36 w dwóch powtórzeniach (?) western blotu kinetyka zmian fosforylacji kinazy FAK pod wpływem AD-O51.4 w komórkach A549 jest odmienna (na górnym blocie fosforylacja FAK pod wpływem AD-O51.4 zwiększa się, a na dolnym – zmniejsza)?
- I w tym rozdziale Doktorantowi nie udało się uniknąć kolokwializmów i anglicyzmów. Dla przykładu: myszy nie są „traktowane” lekiem; komórki mają a nie „posiadają” dane białko. Nieprawidłowo używane jest słowo pacjent w odniesieniu do osoby chorej. Słowo „pacjent” oznacza jedynie „klienta” lekarza. Nie można leczyć pacjentów, bowiem niektórzy są osobami zdrowymi.

Zawarte w tym rozdziale wnioski zostały wyciągnięte poprawnie, można mieć jedynie drobne zastrzeżenia do ich językowego ujęcia („cząsteczka [...] jest w stanie ominąć oporność...”; „transdukuje sygnał proapoptotyczny do wnętrza komórki”). Za najciekawsze wyniki uważam te, które wskazują na działanie cząsteczki AD-O51.4 wykraczające poza samą indukcję apoptozy czy wpływ na angiogenezę: zmiany w glikokaliksie komórek nowotworowych i komórek śródbłonna pod jej wpływem, zmiany w metabolizmie glukozy w komórkach śródbłonna oraz elektrostatyczne oddziaływanie peptydu efektorowego tej cząsteczki z powierzchnią komórek nowotworowych.

Dyskusja wyników jest wyczerpująca i merytoryczna, co potwierdza dobre przygotowanie naukowe Doktoranta.

Piśmiennictwo obejmuje imponujące 238 pozycji, zdecydowana większość przytaczanych artykułów została opublikowana w ciągu ostatnich 10 lat w recenzowanych, anglojęzycznych czasopismach. Odniesienia do światowej literatury zostały przygotowane prawidłowo i wspierają treść rozprawy.

W podsumowaniu chciałabym podkreślić, że przedłożoną mi do recenzji rozprawę oceniam pozytywnie, a powyższe (drobne) uwagi są jedynie przyczynkiem do dyskusji z Doktorantem.

Stwierdzam zatem, że oceniana przeze mnie rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i

tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.nr 65, poz. 595 z późn.zm.). W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady o dopuszczenie mgr. Damiana Klóski do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



Prof. dr hab. n. med. Dominika Nowis
p/o kierownika Laboratorium Medycyny Doświadczalnej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Jana Nielubowicza 5, blok F
02-097 Warszawa
tel.: 22 599 21 89
e-mail: dominika.nowis@wum.edu.pl