Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

Sosnowiec 09.07.2021r.

Dr hab. n .med.
Ilona Bednarek
Prof. SUM

Zakład Biotechnologii
i Inżynierii Genetycznej

Wydział Nauk
Farmaceutycznych
w Sosnowcu

41-200 Sosnowiec,
ul. Jedności 8

Kierownik Zakładu
dr hab. n .med. Ilona
Bednarek Prof. SUM
tel.: (+48 32) 364 12 73
fax: (+48 32) 364 12 76
ibednarek@sum.edu.pl

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
mgr Piotra Kamila Rózgi

Opracowanie nowego rekombinowanego białka fuzyjnego o właściwościach proapoptotycznych i antyangiogennych, do celowanej terapii przeciwnowotworowej

Praca wykonana w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJ CM
Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Pękala

Informacje ogólne

Podstawą ubiegania się mgr Piotra K. Rózgi o stopień naukowy doktora jest opracowana monografia pt., *Opracowanie nowego rekombinowanego białka fuzyjnego o właściwościach proapoptotycznych i antyangiogennych, do celowanej terapii przeciwnowotworowej*", która powstała pod kierunkiem Pani Profesor dr hab. Elżbiety Pękala, kierownika Zakładu Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie.

Rozprawa doktorska zawiera 142 strony i składa się kolejno: z informacji o źródłach finansowania badań będących podstawą dysertacji; informacji o przedstawieniu cząsteczki białka fuzyjnego jako przedmiotu patentu WO2012093158 oraz publikacji doi:10.1002/ijc.32845 (gdzie pierwszym autorem jest Doktorant); wykazu skrótów; streszczenia w języku polskim i angielskim wraz ze słowami kluczowymi; wstępu teoretycznego odnoszącego się do tematyki badawczej dysertacji; celu pracy; opisu materiałów i metodyki badawczej; wyników i ich dyskusji wraz z wyodrębnionym podsumowaniem oraz ostatniego elementu pracy doktorskiej - wykazu bibliografii składającej się 422 pozycji.

Ocena rozprawy doktorskiej

Tematyka rozprawy dotyczy opracowania strategii terapii przeciwnowotworowej, która w oparciu o zaprojektowaną nową rekombinowaną cząsteczkę białka wykazywałaby efekty ograniczające rozrost zmian nowotworowych, tak poprzez efekt bezpośredniej indukcji apoptozy komórek, jak i działanie antyangiogenne w odniesieniu do struktury masy guza. Podjęta przez Doktoranta tematyka jest niezwykle istotna, a równocześnie trudna, stojąca przed oczekiwaniem pacjentów na nowe rozwiązania efektywnej terapii nowotworów. Biorąc pod uwagę wzrost liczby zachorowań na nowotwory oraz pojawiające się nowe warianty oporności na leczenie zasadność wybranego kierunku badań Doktoranta jest bezsprzeczna.

Streszczenie rozprawy stanowi dobrze opracowaną syntezę tematu wraz z nakreśleniem efektów prowadzonych badań. *Część teoretyczna* przedstawia przegląd informacji na temat procesu apoptozy, jej regulacji, bezpośredniego powiązania z cząsteczką TRAIL, kolejno przechodząc do szczegółowych danych na temat budowy TRAIL, (liganda, receptorów), funkcji biologicznych i aspektów oporności komórek na TRAIL. Podstawy biologii komórki nowotworowej w aspekcie biologii angiogenezy nowotworowej są płynnym powiązaniem drugiej części tematycznej wstępu - angiogenezy i jej regulacji w szczególnym powiązaniu z nowotworzeniem. Doktorant bazuje na licznych źródłach naukowych (łącznie w pracy cytowanych jest aż 422 pozycji literaturowych), słabą strona jest to, iż tylko 24 prace to publikacje z ostatnich 5 lat (niespełna 6%). Być może z tym wiążę się nie zawsze podawanie aktualnych zapisów, np. typu: *Dotychczas zidentyfikowano 19 ligandów rodziny TNF.....*, gdzie Doktorant powołuje się na pracę z 2002 roku (str. 105; pozycja lit. 404). Bez względu na wcześniejszą uwagę część teoretyczna opracowana jest poprawnie i szczegółowo.

Przedstawiony *cel pracy* jest sformułowany jasno i logicznie, jednoznacznie nakreśla *etapy badań* pokazując równocześnie złożoność procedur badawczych i ogromny nakład pracy do uzyskania efektu końcowego. Doktorant od zaprojektowania sekwencji aminokwasowej białka fuzyjnego VCTR4.0 (opracowanej tak, aby cząsteczka charakteryzowała się selektywnością TRAIL względem komórek

nowotworowych z równoczesnym hamowaniem angiogenezy poprzez blokadę receptorów dla VEGF), poprzez całą procedurę inżynierii genetycznej i bioprocesu, produkuje w systemie ekspresyjnym *E. coli* białko fuzyjne, po czym przeprowadza jego pełną charakterystykę fizykochemiczną, aż po weryfikację aktywności biologicznej w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Niesamowity nakład pracy, niesamowite efekty!

Dyskusja przedstawiona na 15 stronach manuskryptu jest nie tylko analizą otrzymanych wyników ale również odniesieniem się do danych literaturowych. "Odświeżenie" zasobów bibliografii mogłoby być cenne do poszerzenia rozważań. Uaktualniając wiedzę, może warto odnieść się np. do powiązania TRAIL z autofagią w aspekcie eliminacji komórek nowotworowych?

Cennym rozwiązaniem opracowanej dyskusji jest jej usystematyzowanie w odniesieniu do kolejnych etapów zrealizowanych badań. Zakończenie rozdziału *podsumowaniem* w miejsce opracowania wniosków można przyjąć za rozsądne podejście przy reasumowaniu bardzo licznej puli cząstkowych efektów prac badawczych.

Analiza dysertacji wyłoniła pewne aspekty, których doprecyzowanie recenzent uważa za celowe.

Zapisy w rozdziałach dotyczących *Metodyki*, *Wyników* i ich omówienia są częściowo niespójne lub rozbieżne. W jakim podłożu i z dodatkiem jakich suplementów prowadzona była hodowla linii HUVEC? Które z informacji są właściwe? str. 56 (podłoże M199) czy str. 69 (podłoże MCDB131)? W tym miejscu zwracam uwagę na błędny zapis czynnika wzrostu na str. 69 (EGF nie EFG), chyba, że doktorant uwzględnia inne suplementy z dodatkowym zapisem *ECGS* w formie niewyjaśnionej w wykazie skrótów (zapis na str. 56:).

W opisach protokołów, w których zastosowana była technika wirowania celowym byłoby ujednolicenie podania warunków wirowania. Raz pojawia się zapis "RPM" (str. 59, przy braku informacji na temat stosowanej wirówki i rotora), na stronie 61 jest juz zapis RCF, a na str. 64 "x g", czy str. 67 "x G".

Zapis dotyczący dezintegracji komórek *E. coli* (str. 59/60) techniką sonikacji wymaga uzupełnienia o podanie wartości

parametru stosowanej przez Doktoranta częstotliwości ultradźwięków.

W części wynikowej na str. 82 pojawia się zapis: "*Finalnie w wyniku oczyszczania i przeformułowania uzyskano 180 mg białka VCTR4.0*" Czy ilość ta pochodziła z produkcji bioreaktorowej o objętości 4L, 10L, czy łącznej?

Czy ilustrująca wpływ białek TRAIL i VCTR4.0 na poziom Bid rycina 41 na str. 93 została mylnie opisana? Czy nie powinny być tam przy białku TRAIL zapisy, odpowiednio dla czasu, 30; 60 i 120 minut zamiast podanych: 3; 6 i 12?

W opisie wyników brak jest odniesienia w tekście do ryciny 44 na str. 97. Na str. 99 zapisane jest błędne odwołanie do ryciny 47 zamiast 46 w ocenie zmian masy ciała myszy pod wpływem działania białka VCTR4.0 w dawce 130mg/kg.

Zdaniem recenzenta w pracy brak jest danych analizy statystycznej odnoszącej się do istotności obserwowanych zmian pod wpływem rekombinowanego białka fuzyjnego, szczególnie testowanego w warunkach *in vitro* hodowli komórkowych wybranych linii nowotworowych. Umieszczenie takich danych byłoby wartościowym punktem dla oceny aktywności uzyskanego preparatu białkowego.

Proszę o wyjaśnienie i uzupełnienie informacji zawartych w rozdziale 4.2.2. "Wpływ buforu formulacyjnego na aktywność białka VCTR4.0" (str. 85-86). Doktorant podaje: "*Opracowanie buforu formulacyjnego jest istotnym zadaniem podczas rozwoju przedklinicznego.....*" ???? Następnie pojawia się mała-nieczytelna rycina 32, której analizy i oceny w podanej wersji wydruku manuskryptu recenzent nie jest w stanie przeprowadzić. Na końcu podrozdziału pojawia się "wieńczące" zdanie: "*Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy formulacjami B1 i B6*". W części metodycznej na str. 61 jest podany jedynie "lakoniczny" zapis dotyczący reformulacji, w żadnej innej części rozprawy nie podano informacji odnoszących się do tej części badań. Cały podrozdział sprawia wrażenie "niedokończonego", bądź "niedopracowanego". Proszę o weryfikację danych i zapisów w tej części badawczej rozprawy, ewentualne sprostowanie.

W recenzowanej dysertacji przedstawiony zakres badań jest imponujący. Dysertacja ma formę monografii, nie jest w tym wypadku dołączany wykaz oświadczeń innych współautorów/osób zaangażowanych w pomoc badań, nie mniej jednak pożądanym byłoby podanie informacji na temat zaangażowania Doktoranta w realizację poszczególnych kroków badawczych.

Analizując tekst manuskryptu rozprawy doktorskiej nie znaleziono istotnych błędów edytorskich, nie mniej jednak, przy tak obszernej metodycznie pracy pewne zapisy i terminologia wymagają sprostowania/korekty/wyjaśnienia. W kolejności opracowanych elementów rozprawy zwracam uwagę na zapisy:

W *Spisie treści* (i odpowiednio w tytułach opisywanych rozdziałów) dla podrozdziałów 1.2.5.1-1.2.5.4 odpowiednim do przedstawionych informacji jest zastosowanie terminu "*oporność*", nie jak podaje Doktorant "*odporność*".

W *Wykazie skrótów* Doktorant podaje skróty nazw nukleotydów, zapisy jednak odnoszą się do nazw zasad azotowych (puryn i pirymidyn). PBS to *buforowany* roztwór soli fizjologicznej.

W *Streszczeniu* i kolejno, np. na stronach 105, 109, czy 114 Doktorant stosuje określenie "*zdrowe komórki*" - stosownym jest użycie określenia "*komórki prawidłowe*".

W części *metodyczno-wynikowej* m.in. na str. 51 czy 52 pojawiają się zapisy nazw enzymów restrykcyjnych. Ważnym jest stosowanie zasady nomenklatury i pisowni wg Hamiltona Smitha i Daniela Nathansa, np. *Xho*I czy *Nde*I; również poprawnym byłoby stosowanie terminu: *hydroliza enzymatyczna* w miejsce potocznego określenia: *trawienie* czy *cięcie* (str. 54, 58, 91, 93, 94, 95, opisy ryciny 42, czy tab. 20

Sporadycznie pojawiają się błędy zapisu poszczególnych wyrazów, np. str. 63 *oporne*, zamiast *opornych*, *wrażliwe* zamiast *wrażliwych*, str.64 *przeciwciał* nie *przedzwaniał*, str. 83 *TRAIL*, nie *TRACIL*, str. 85 *wysoka* , nie *wysok*. Najprawdopodobniej funkcja autokorekty tekstu "odpowiada" za wymienione drobne błędy.

Rozprawa opracowana została w sposób estetyczny, nie mniej jednak zwracam uwagę na niefortunne zmniejszanie rycin, przez co stają się one moim zdaniem niemalże całkowicie nieczytelne.

Ryciny: 32 (str. 85/86), 33 i 34 (str. 87) odnoszą się do istotnej części wynikowej, której analiza na miniaturach graficznych z niewidocznymi opisami staje się co najmniej "uciążliwa" a nawet 'niewykonalna". "Zaoszczędzenie" 2-3 stron maszynopisu niekoniecznie jest dobrym rozwiązaniem w odniesieniu do graficznej ilustracji wyników.

Wymienione powyżej uwagi nie wpływają w żadnym stopniu na wartość merytoryczną pracy i jej całościową wysoką ocenę.

Podsumowanie

Osiągnięcie jako całość projektu badawczego jest nowatorskie. Rozległe badania opisane w rozprawie doktorskiej mają charakter multidyscyplinarny i w swoim całokształcie świadczą o niezwykłej dojrzałości naukowej Doktoranta. Poziom dysertacji jest bezsprzecznie bardzo wysoki i w mojej opinii dysertacja zasługuje na wyróżnienie. Podjęta tematyka badawcza jest niezwykle istotna, zastosowana metodyka badań kształtuje się na wysokim poziomie światowym, finalny "produkt" cyklu badań - dostarczenie białka fuzyjnego jako wydajnego leku biologicznego do zastosowania w terapii przeciwnowotworowej jest odzwierciedleniem aplikacyjności prowadzonych przez Doktoranta badań naukowych.

Pracę oceniam jako spełniającą kryteria stawiane rozprawom na stopień doktora nauk farmaceutycznych i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UJ w Krakowie o dopuszczenie magistra Piotra K. Rózgi do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Stosowny wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej przesyłam w załączeniu.

KIEROWNIK
Zakładu Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Ilona Bednarek
dr hab. n. med. Ilona Bednarek, prof. SUM

dr hab. n. med. Ilona Bednarek prof. SUM