

Kraków, 02.01.2024 r.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

PANA MGR INŻ. RADOŚŁAWA BOROWSKIEGO ZATYTUŁOWANEJ

„PERSPEKTYWY ZASTOSOWANIA W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ IMMUNOTOKSYN UKIERUNKOWANYCH NA KOMÓRKI NOWOTWOROWE Z EKSPRESJĄ RECEPTORA IL-13R α 2”

Najczęstszym pierwotnym nowotworem mózgu, stanowiącym około 80% glejaków jest glejak wielopostaciowy (łac. *glioblastoma multiforme*, GBM). Cechuje go bardzo duży stopień złośliwości, w związku z czym rokowanie w GBM jest niepomyślne, niezależnie od stosowania optymalnego, zgodnego z aktualnym stanem wiedzy leczenia. Niska prognozowana długość życia pacjentów skłania do poszukiwań nowych możliwości terapeutycznych, co stanowi cel ocenianej pracy doktorskiej.

Pan mgr inż. Radosław Borowski postawił hipotezę, że immunotoksyny skierowane przeciwko IL-13R α 2 będą wykazywały działanie cytotoksyczne w modelu *in vitro* glejaka wielopostaciowego oraz modelach komórkowych przerzutów różnych nowotworów do mózgu. Swoje badania zrealizował w Instytucie Medycyny Weterynaryjnej w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod opieką dr hab. n. med. inż Beaty Pająk, prof. WIHE. Promotorem pomocniczym była dr n. biol. Angelika Kaczyńska z firmy WPD Pharmaceuticals Sp. z o.o., specjalizującej się w badaniach cząsteczek biologicznych i chemicznych do zastosowania w celowanej terapii glejaka mózgu i innych nowotworów centralnego układu nerwowego.

Wyniki tych badań, przeprowadzonych w modelach *in vitro*, wskazują, iż zastosowanie immunotoksyn ukierunkowanych na receptor IL-13R α 2 jest obiecującą strategią terapeutyczną, która powinna być rozwijana w kolejnych etapach prac badawczych.

Formalny opis rozprawy

Praca doktorska ma klasyczny układ. Po informacjach formalnych, tzn. oświadczeniach promotora i autora pracy a także danych dotyczących finansowania badań, przedstawiono skondensowane Streszczenie w języku

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://bioccka.moi.uj.edu.pl/zbn>

polskim i angielskim. Kolejne rozdziały to Wykaz skrótów, Wstęp, Cel Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja i Wnioski. Pracę zamyka prawidłowo sformatowane Piśmiennictwo obejmujące 196 pozycji oraz Wykazy Rycin i Tabel.

Praca jest napisana w języku polskim. Błędy literowe czy składniowe są nieliczne, np. skrót GBM w kilku miejscach został podany błędnie jako GMB (np. strony 20, 27, 38, 98); na stronach 49, 55 – w tytułach rozdziałów 3.3. Badania cytotoksyczności immunotoksyn na modelu *in vitro* oraz 3.3.6. Analizy cytotoksyczności immunotoksyn na modelu *in vitro* proponowałabym używać formy „w modelu *in vitro*”, niejasne jest np. sformułowanie na stronie 103 – „podjęto próby uchwytu IL-13R α 2 w immunoterapii przy użyciu modyfikowanych limfocytów T”.

Mam też kilka sugestii do **Wykazu skrótów**, który jest obszerny i w większości prawidłowo przygotowany. Zdaję sobie sprawę z trudności w przetłumaczeniu skrótów z języka angielskiego, ale niektóre zaproponowane przez Doktoranta określenia nie wydają mi się prawidłowe. Przykładem może być skrót ATCC – czy nie lepszym tłumaczeniem jest Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych zamiast Kolekcja Kultur Typu Amerykańskiego? Podobnie, Doktorant pisze, że SNAIL to palec cynkowy rodziny snail 1 a może lepiej opisać go jako czynnik transkrypcyjny z rodziny SNAIL, o strukturze palca cynkowego? Ponadto, DTE to ditioerytrytol a nie dithioerythritol. Szkoda, że w Wykazie skrótów nie umieszczono informacji o dwóch badanych immunotoksynach.

Te i inne, nieliczne drobne nieścisłości językowe nie wpływają na wysoką, ogólną ocenę edytorskiego opracowania całej pracy.

Ocena merytoryczna

Pracę otwiera dość obszerny, bo liczący 23 strony **Wstęp**, podzielony na trzynaście podrozdziałów. W tej części skupiono się na opisie i klasyfikacji nowotworów mózgu, opisano dostępne terapie GBM, koncentrując się na przedstawieniu możliwości stosowania immunotoksyn. Szczególną uwagę zwrócono na opis IL-13R α 2 jako celu terapii przeciwnowotworowych. Wstęp czyta się bardzo dobrze, Doktorant dokonał wyboru najważniejszych informacji, przedstawiając kluczowe aspekty terapii nowotworów mózgu, podkreślając istniejące problemy i ograniczenia różnych podejść terapeutycznych. Po lekturze tej części rozprawy, czytelnik jest dobrze wprowadzony w tematykę stanowiącą podstawę przeprowadzonych badań. Dobrze ocenić należy szatę graficzną tej części pracy – Autor zobrazował treści we Wstępie 3 rycinami, w tym grafiką przygotowaną



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,

Biologii i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biolka.moi.uj.edu.pl/zbm>

w programie *Biorender*, oraz czytelnymi 2 tabelami. Ostatni podrozdział Wstępu, zatytułowany „Hipoteza badawcza” jest wprowadzeniem do dobrze sformułowanego **Celu pracy**. Pan mgr inż. Borowski, wyznaczył nadrzędny cel, jakim było porównanie cytotoksycznego oddziaływania dwóch immunotoksyn skierowanych przeciwko receptorowi IL-13R α 2, skoniugowanych ze zmodyfikowanymi bakteryjnymi egzotoksynami:



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

w modelu *in vitro* glejaka oraz przerzutów innych typów nowotworów do mózgu. Sprecyzował również trzy szczegółowe cele badawcze.

Rozdział **Materiały i Metody** zawiera dokładne opisy zastosowanych procedur, co umożliwi innym badaczom odtworzenie przeprowadzonych doświadczeń. Doktorant szczegółowo przedstawił protokoły badań, między innymi opisał produkcję białek rekombinowanych w prokariotycznym systemie ekspresyjnym i ich oczyszczanie

W celu zbadania cytotoksyczności immunotoksyn *in vitro* analizował żywotność wykorzystując test MTS, proliferację poprzez badanie wbudowania bromodeoksyurydyny (BrdU), syntezę białka testem z sulforodaminą (SRB), zdolność tworzenia kolonii poprzez wykonanie testu klonogeniczności a także oceniał indukcję apoptozy. Mgr inż. Borowski oceniał również poziom receptora IL-13R α 2 wykorzystując techniki immunocytochemiczne.

Opisy są dokładne, oprócz protokołu danej metody zamieszczono również wzory, które służyły do obliczenia np. procentowych zmian w żywotności i proliferacji komórek traktowanych badanymi immunotoksynami.

Przedstawione tu 2 tabele są bardzo informatywne: w pierwszej zebrano używane linie nowotworowe, w drugiej sprecyzowano warunki ich hodowli. Takie przedstawienie danych dla 15 różnych linii komórkowych jest bardzo pomocne dla czytelnika.

Moja drobna sugestia dotycząca tej części pracy dotyczy podziału na rozdziały i podrozdziały. Rozdziały 3.3.7-3.3.11, w mojej opinii powinny być numerowane jako 3.3.6.1-3.3.6.5, bo stanowią rozszerzenie Rozdziału 3.3.6. zatytułowanego 'Analizy cytotoksyczności immunotoksyn na modelu *in vitro*' i opisują konkretne testy wykonane właśnie w celu analizy cytotoksyczności.

Ostatnim punktem tej części jest opis przeprowadzonej analizy statystycznej i jej oznaczenia na wykresach. Tu wdarał się błąd przy opisie literowym

Wydział Biochemii,

Biologii i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka t.c

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 8412

fax +48 12 664 8918

agnieszka.toboda@uj.edu.pl

https://biocika.moi.uj.edu.pl/21

zastosowanym do zaznaczenia istotności, bowiem litery C i D pojawiają się w tym opisie dwukrotnie, zamiast A i B (* lub D dla $P < 0,1$; ** lub C dla $P < 0,05$; *** lub C dla $P < 0,01$; D**** lub A dla $P < 0,001$). Brakuje też wyjaśnienia pojawiającego się w sekcji *Wyniki* oznaczenia literowego E jako braku istotności statycznej. Po lekturze tej części pracy zastanawiałam się, jaki był zamysł wprowadzenia dwóch systemów oznaczeń istotności (literowy i z wykorzystaniem symboli). Dopiero w sekcji *Wyniki*, przekonałam się, że był to celowy zabieg, związany z oznaczeniem rodzaju porównań, gdzie symbole oznaczały poziom istotności względem kontroli, a litery poziom istotności różnic pomiędzy traktowaniami. Te wyjaśnienia powinny znaleźć się już w opisie analizy statystycznej.

Rozdział **Wyniki** został podzielony na dwie główne części, a w ich obrębie dokonano dalszych podziałów, koncentrując się na konkretnych zadaniach badawczych. Na końcu, w oddzielnym rozdziale, przedstawiono krótkie Podsumowanie wyników. Rozdział Wyniki jest zebrany na 43 stronach i zawiera 26 często panelowych rycin oraz 2 tabele.

Do najważniejszych wyników należy uznać wykazanie, że badane immunotoksyny są cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych z ekspresją receptora IL-13R α 2 proporcjonalną do poziomu tego receptora na powierzchni komórki.

Doktorant wykazał również zróżnicowane działania cytotoksyczne wobec komórek przerzutów nowotworów do mózgu oraz nowotworu sutka i prostaty, zależne od ilości receptora, przy czym największe działanie cytotoksyczne obserwował wobec komórek przerzutów czerniaka do mózgu oraz nowotworu prostaty.

Ta sekcja jest przygotowana starannie, jednak w wielu przypadkach wykresy nie są przejrzyste i czytelne. Pan mgr inż. Borowski analizował wiele stężeń badanych immunotoksyn w dwóch różnych punktach czasowych i mnogość wyników, pokazana na jednym wykresie wpływa na (utrudnia) ich czytelność. Jakość zdjęć z mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiających barwienie na obecność receptora IL-13R α 2 jest bardzo dobra. Nie jest dla mnie do końca jasne, co kryje się pod nazwą kontrola (prezentowana jako dolny panel na zdjęciach na Rycinie 20). Wydaje się, że są to komórki, w których wybarwiono jedynie jądra komórkowe ale nazwa kontrola jest nieco myląca. Czy to kontrola bez przeciwciał pierwszorzędowych? Proszę o wyjaśnienie.

Po analizie wszystkich badanych linii, Doktorant podzielił je na cztery grupy, różniące się poziomem (jak pisze koncentracją) receptora IL-13R α 2. Taki podział jest bardzo istotny, bo później wyniki z analiz cytotoksyczności korelowane są



Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Lebeda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6818

agnieszka.lebeda@uj.edu.pl

<http://bioteka.moi.uj.edu.pl/zbn>

właśnie z ekspresją wspomnianego receptora. Zastanawia mnie jedynie wynik dla linii T-470 (Ryc. 20C), sklasyfikowanej jako linia z niskim poziomem receptora. Analiza tego zdjęcia nie do końca to prezentuje, ale pewnie wniosek został wyciągnięty na podstawie analizy większej liczby obrazów. Przy okazji zapytam czy podjęto próbę zliczenia sygnału fluorescencyjnego pochodzącego od fluorochromu Alexa Fluor 578 za pomocą specjalnego oprogramowania czy wniosek o zróżnicowanej ekspresji receptora wyciągnięto jedynie na podstawie ogólnej analizy zdjęć? Wydaje się, że zliczenie specyficznego sygnału mogłoby być bardziej dokładną metodą (i wtedy bardziej uzasadnione byłoby określenie „koncentracja”), niż ogólna analiza zdjęć.

Proszę o wyjaśnienie w jakim stężeniu stosowany był CHX, stanowiący kontrolę pozytywną. W opisie metod podano, że było to 5 µg/ml (str. 55, 57, 58) a w części opisującej wyniki – 5 µM (str. 74 i dalej w opisie poszczególnych rycin).

Jestem pod wrażeniem liczby linii komórkowych użytych do analizy wpływu badanych immunotoksyn. Praca z 15 różnymi liniami komórkowymi, ich stymulacja różnymi związkami w dwóch różnych punktach czasowych a następnie wykonanie właściwych testów biologicznych wymagały od Doktoranta wielu godzin spędzonych w laboratorium. Można odczuwać pewien niedosyt, że oprócz badań cytotoxyczości nie przeprowadzono innych analiz, np. badania ekspresji mRNA czy białek kluczowych dla różnych procesów komórki nowotworowej, ale zapewne takie analizy są planowane w dalszych etapach projektu, już na zawężonej puli linii komórkowych z wyselekcjonowanymi stężeniami związków i czasów stymulacji.

Część rozprawy opisująca uzyskane wyniki jest dobrze skomponowana, Pan mgr inż. Radosław Borowski dołożył wszelkich starań, aby jasno i klarownie opisać wyniki doświadczeń. Co ważne, wyniki zostały poddane rygorystycznej analizie statystycznej. Autor co prawda skupił się głównie na wyznaczeniu istotności komórek stymulowanych względem kontroli (tylko w niektórych przypadkach dokonał również analizy statystycznej pomiędzy traktowaniami), ale mógł również analizować np. czy badany efekt jest zależny od czasu stymulacji. Czy takie porównanie nie byłoby interesujące?

Inna moja sugestia dotyczy warunków prowadzonych doświadczeń *in vitro*. Wszystkie badania wykonano w warunkach normoksji, czyli normalnego poziomu tlenu. Co myśli Doktorant o analizach badanych związków w warunkach niedotlenienia? Hipoksja to nieodłączny stan związany z nowotworzeniem, szczególnie istotny również dla rozwoju GBM, ich unaczynienia, metabolizmu czy inwazyjności. Według danych literaturowych, stężenie tlenu w ludzkim mózgu waha się od około 4,6% O₂ w zdrowej tkance do 1,7% O₂ w nowotworach mózgu



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://bioteka.moi.uj.edu.pl/bzm>

[Muz B et al., *The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. Hypoxia. 2015; 83*]. Czy rozważano przeprowadzenie analogicznych analiz np. w warunkach 2%-1% poziomu tlenu?

Dyskusja jest napisana ciekawie, dobrze się ją czyta. Doktorant ze swobodą interpretuje uzyskane wyniki na tle literatury przedmiotu i cytuje wiele nowych publikacji.



UNIWERSYTET
JAGIELLONSKI
W KRAKOWIE

Podsumowanie

Stwierdzam, iż uzyskane przez Pana mgr inż. Radosława Borowskiego wyniki poszerzają wiedzę dotyczącą możliwych terapii bardzo złośliwych nowotworów mózgu. Wyniki te są co prawda wstępem do dalszych, bardziej zaawansowanych badań, ale dają dobre podwaliny do przeprowadzenia zarówno dalszych testów *in vitro* jak i *in vivo*.

W mojej opinii, praca stanowi dowód na posiadaną przez Doktoranta wiedzę teoretyczną i praktyczną znajomość technik metod biologii molekularnej niezbędnych do prowadzenia pracy badawczej. Pan mgr inż. Borowski wykonał szereg doświadczeń a ich wyniki w wyczerpujący sposób przeanalizował i przedyskutował. Na podstawie wyników swoich badań wyciągnął prawidłowe wnioski.

Potwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2021 r. poz. 478.

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pana mgr inż. Radosława Borowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,

Agnieszka Łoboda

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 684 8412

fax. +48 12 684 8818

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

https://bioteka.moi.uj.edu.pl/zbm