



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Jana Barczyńskiego

Niniejsza recenzja rozprawy doktorskiej została przygotowana w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Biotechnologia, prof. dr hab. Mariusza Grinholca z dnia 13 grudnia 2024 roku. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Bielawskiego. Opiekę nad mgr Janem Barczyńskim sprawował dr Tomasz Sitar w ramach programu doktoratów wdrożeniowych. Badania zostały przeprowadzone w Zakładzie Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Praca zawiera wszystkie treści niezbędne do jej rzetelnej oceny w kontekście wymogów wskazanych w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce jako niezbędnych do nadania stopnia doktora.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Jana Barczyńskiego została przygotowana w języku polskim i liczy ponad 130 stron. Praca ma charakter monografii, zawierając wstęp teoretyczny, szczegółowy opis metod badawczych, wyniki eksperymentalne oraz ich interpretację w kontekście aktualnej literatury naukowej. Została ona przedstawiona Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego celem uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych.

Struktura pracy jest przejrzysta i zgodna z przyjętymi standardami, składając się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazu skrótów, rozbudowanego wstępu teoretycznego, opisu celów pracy, materiałów i metod, opisu i analizy wyników, dyskusji oraz bibliografii. Układ jest klarowny i logiczny.

Ocena merytoryczna

Praca mgr Jana Barczyńskiego dotyczy produkcji i oceny przeciwnowotworowego potencjału przeciwciał bispecyficznych, które są

wykorzystywane w immunoterapii nowotworów. Nowotwory złośliwe pozostają jedną z głównych przyczyn śmiertelności na świecie, a rozwój nowych terapii ukierunkowanych na specyficzne cele molekularne stanowi jedno z najważniejszych wyzwań współczesnej onkologii.

W części teoretycznej pracy, doktorant wykazał się znajomością aktualnego stanu wiedzy w zakresie immunoterapii nowotworowej oraz technologii produkcji przeciwciał. We wstępie rozprawy przedstawił szeroki przegląd literatury, obejmujący zarówno podstawy immunoterapii, jak i istniejące przykłady wykorzystania przeciwciał w terapii przeciwnowotworowej. Opis ma charakter pogłębiony, włączając w to szczegółowy opis działania przeciwciał i ich zastosowanie w blokowaniu kluczowych szlaków sygnalizacyjnych w komórkach nowotworowych. Przedstawione wyniki obejmują produkcję białek i przeciwciał, jak również analizę efektywności przeciwciał oraz ich wpływu na lizę komórek nowotworowych. Ponadto sprawdzono na ile wyprodukowane przeciwciała wpływają na produkcję cytokin prozapalnych w komórkach PBMC oraz zmiany w subpopulacjach limfocytów T CD4+.

Przedstawiona praca wpisuje się w nurt badań nad immunoterapią nowotworów, skupiając się na przeciwciałach, które mogą jednocześnie rozpoznawać dwa różne antygeny nowotworowe (ROR-1 i PD-L1 oraz mezotelina i PD-L1), co ma duży potencjał aplikacyjny w terapii. Zgodnie z moją wiedzą jest to pierwsze tego typu opracowanie i chociaż badania mają charakter wstępny, pozwalają na wytyczenie kierunków przyszłych działań. Podjęta problematyka jest aktualna i istotna, a wyniki badań mogą znaleźć zastosowanie w projektowaniu nowych strategii terapeutycznych.

W ramach przeprowadzonych prac opracowano system produkcji przeciwciał bispecyficznych, które efektywnie (podobnie jak przeciwciała monospecyficzne) wiążą się do celów molekularnych (ROR-1, Mezotelina, PD-L1), jak wykazano za pomocą testu ELISA. Co ważne, przeciwciała bispecyficzne utrzymały wysoką skuteczność blokowania interakcji PD-1/PD-L1, co jest kluczowe dla umożliwienia rozpoznania komórek nowotworowych przez komórki układu odpornościowego.

Bardzo ważne wyniki przedstawiono w rozdziale 8.6., gdzie jednoznacznie przedstawiono, że przeciwciała bispecyficzne są bardziej efektywne niż mieszanina przeciwciał monospecyficznych, co sugeruje potencjał opracowanego rozwiązania w

przyszłych strategiach leczenia choroby nowotworowej. Brakuje mi jednak w tym miejscu komparatora, na przykład opisanych wcześniej przeciwciał bispecyficznych. W rozdziale 8.7 przedstawiono wyniki dla pojedynczego dawcy, co stawia znak zapytania nad wiarygodnością wartości przedstawionych danych. Dalsza analiza prowadzona przez autora pokazuje, że poziom IL-10, IFN γ , TNF α i Granzymu B jest wyższy, natomiast IL-2 niższy przy zastosowaniu przeciwciał bispecyficznych w porównaniu do kombinacji przeciwciał monospecyficznych. Również w tym przypadku brak wiarygodnego komparatora. Dalsze badania pokazały, że przeciwciała bispecyficzne w większym stopniu niż monospecyficzne powodują obniżenie poziomu limfocytów T-regulatorowych oraz zwiększają populację limfocytów CD4 $^+$ CD25 $^-$ CD127 $^-$. Moją ciekawość wzbudza fakt, że stosowanie mieszaniny przeciwciał monospecyficznych prowadzi do podniesienia poziomu limfocytów T CD4 $^+$ CD25 $^+$ CD127 $^{\text{low}}$ m.in. na rycinie 44. Czy jest statystycznie istotna różnica pomiędzy komórkami nowotworowymi + PBMC nie traktowanymi niczym oraz traktowanymi przeciwciałami bispecyficznymi? Ponownie, brak komparatora o ustalonej efektywności.

Ponadto, nasuwają mi się następujące pytania i uwagi:

1. Dlaczego nie wykorzystano nanoprzeciwciał, których produkcja jest znacznie prostsza i tańsza, a immunogenność niższa?
2. Opis rycin jest bardzo niejasny. Brak odniesień do rycin w tekście sprawia, że analiza przedstawionych danych jest utrudniona. W tym kontekście brak informacji o liczbie powtórzeń oraz dawców w legendzie rycin może być podstawą do kwestionowania przedstawionych danych.
3. Jaka jest selektywność przeciwciał? Wśród eksperymentów brak kontroli z wykorzystaniem komórek i tkanek pierwotnych. Brak również eksperymentów *in vivo*.
4. Dlaczego nie wykorzystano sferoidów, które lepiej oddałyby mikrośrodowisko nowotworu?
5. Czy poddano analizie parametry farmakokinetyczne przeciwciał oraz ich stabilność?

Bibliografia jest obszerna i aktualna, obejmuje zarówno fundamentalne pozycje, jak i najnowsze publikacje w dziedzinie. Wykorzystanie źródeł naukowych o wysokim wpływie wskazuje na dobrą orientację doktoranta w literaturze przedmiotu.

Badania ujęte w pracy zostały przeprowadzone w ramach programu "Doktorat Wdrożeniowy", a praca ma charakter aplikacyjny. Badania były realizowane w firmie biotechnologicznej Recepton Sp. z o.o., co wymagało umiejętności pracy w środowisku akademicko-przemysłowym. Zakres przeprowadzonych eksperymentów świadczy o kompetencjach badawczych doktoranta i jego umiejętności planowania badań. Nowatorski charakter badań oraz ich aplikacyjność w dalszych pracach przedklinicznych czynią rozprawę wartościowym wkładem w rozwój immunoterapii nowotworów.

Ocena edytorska rozprawy

Praca została napisana starannie, w sposób klarowny i logiczny. Język rozprawy jest precyzyjny, a treść dobrze zorganizowana. Największą wadą jest bardzo niejasny i niepełny opis ilustracji, wykresów i tabel. Brak odniesień w tekście do poszczególnych rycin jest błędem. Wykorzystanie terminologii naukowej jest prawidłowe, a wywód klarowny. Z mniejszych błędów edytorskich można wymienić pewną niespójność w oznaczeniach; w przypadku jednostek alfanumerycznych pomiędzy wartością i oznaczeniem jednostki powinna znajdować się spacja; litr zgodnie z nomenklaturą SI oraz GUM zapisuje się małą literą.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr Jana Barczyńskiego stanowi wartościowy i oryginalny wkład w rozwój biotechnologii i immunoterapii nowotworów. Pomimo pewnych niedociągnięć praca jest kompleksowa, prezentuje wysoki poziom metodologiczny oraz wartościowe wyniki badań. Doktorant wykazał się zarówno bardzo dobrą znajomością literatury, jak i umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań eksperymentalnych.

Na podstawie przeprowadzonej oceny, stwierdzam, że praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr Janowi Barczyńskiemu do obrony rozprawy doktorskiej.