



Szczecin 15.06.2023 r.

Recenzja Rozprawy Doktorskiej

Mgr Aliny Drzyzgi

„Wpływ aktywacji białka STING na polaryzację mikrośrodowiska nowotworowego oraz skuteczność terapii przeciwnowotworowej”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana przez mgr Alinę Drzyzgę pod kierunkiem promotora - dr hab. Ryszarda Smolarczyka, w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach.

Ocena układu, struktury podziału treści, kolejności rozdziałów i kompletności tez powyższej rozprawy doktorskiej.

Praca posiada klasyczny układ: wstęp (23 strony), metodologiczne podstawy badań (27 strony), wyniki opisane na 56 stronach, dyskusję obejmującą 18 stron maszynopisu oraz założenia i cel pracy. Ponadto: wnioski, streszczenia w j.polskim i angielskim oraz indeks skrótów i bibliografię liczącą 255 pozycji. W pracy nie zamieszczono spisu tabel i rycin. Praca liczy 169 stron oraz zawiera 19 tabel i 50 rycin. Układ pracy jest przejrzysty, czytelny i logiczny, a przygotowany tekst w sposób prawidłowy prezentuje zagadnienia związane z wybraną tematyką badawczą.

Merytoryczna ocena pracy doktorskiej

Uwagi ogólne:

Aktualnie, immunoterapia jest jedną z najszybciej rozwijających się, jak również jedną z najbardziej obiecujących strategii przeciwnowotworowych. Immunoterapia zakłada wykorzystanie istniejących mechanizmów cytotoksycznych układu odpornościowego oraz ich aktywację w celu eliminacji komórek nieprawidłowych. Strategia ta wymaga wprowadzenia zmian biologicznych w obrębie mikrośrodowiska guza tak, aby komórki układu odpornościowego (m.in. cytotoksyczne limfocyty T, komórki NK, neutrofile) uległy mobilizacji i były w stanie rozpoznać oraz zwalczać komórki nowotworowe.

Przesłankami do podjęcia niniejszych badań było poznanie mechanizmów, które umożliwiają swoistą transformację i zmianę charakteru mikrośrodowiska nowotworowego z immunosupresyjnego na immunomodulujący. Wyniki badań naukowych wskazują, iż ścieżka

sygnalizacyjna cGAS-STING odgrywa ważną rolę w rekrutacji oraz reaktywacji komórek układu odpornościowego. Głównym celem badań prowadzonych w ramach niniejszej dysertacji jest opracowanie nowej terapii antynowotworowej wykorzystującej aktywatory wyżej wspomnianej ścieżki sygnałowej oraz połączenie jej z innymi terapiami przeciwnowotworowymi, jak inhibicja procesu naczyńotworzenia w obrębie tkanki guza lub blokowanie punktów kontrolnych układu odpornościowego.

Zgodnie z przedstawionymi celami, autorka pracy doktorskiej, mgr Alina Drzyzga, analizuje zagadnienia dotyczące aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej STING oraz zmian fenotypowych leukocytów mikrośrodowiska nowotworowego. Wszystkie te działania umocowane są w kontekście opracowania nowych strategii leczniczych, polegających na indukcji antynowotworowych komórek układu odpornościowego. Doktorantka w swoich badaniach wykorzystuje dwa mysie modele nowotworów (czerniak B16-F10 i rak sutka – 4T1). Niniejsza praca doktorska jest podzielona na trzy etapy. W pierwszym Doktorantka skupiła się na wykazaniu skuteczności badanego agonisty białka STING (2'3'-cGAMP) stymulując komórki prawidłowe oraz nowotworowe. Na tym etapie Doktorantka oceniła metodami *in vitro*: proliferację komórkową, aktywację samego białka STING, jego fosforylację oraz sekrecję wybranych cytokin pod wpływem agonisty białka STING. Drugi etap doświadczeń (*in vivo*) przeprowadzono na mysich modelach w.w. nowotworów, gdzie badano zmianę fenotypów neutrofili oraz ich zdolność do infiltracji tkanki guza pod wpływem agonisty białka STING (2'3'-cGAMP). W trzecim etapie badań wykorzystano dodatkowo czynnik przeciwnaczyniowy (fosforan kombretastatyny A-4 – CA4P) jako model terapii skojarzonej. Ponadto, z uwagi na podwyższoną ekspresję PD-1 w komórkach, zastosowano także trzeci składnik terapii skojarzonej – przeciwciało anty-PD-1.

Merytorycznie i koncepcyjnie praca jest bardzo dobrze przygotowana, zastosowano szereg nowoczesnych, komplementarnych technik i uzyskano wiele obiecujących wyników. Dobór użytych metod i narzędzi jest adekwatny do postawionych celów.

Uwagi szczegółowe:

Wstęp pracy w sposób logiczny wprowadza czytelnika do zagadnień będących tematem niniejszej rozprawy doktorskiej oraz odpowiednio uzasadnia wybór tematyki badań. Wstęp został podzielony na cztery odrębne części: pierwsza - opisuje mikrośrodowisko nowotworowe, druga - rolę neutrofili w mikrośrodowisku nowotworowym, trzecia - patofizjologię nowotworowych naczyń krwionośnych oraz czwarta - założenia immunoterapii nowotworów.

Opis mikrośrodowiska nowotworowego, który otwiera pierwszą część **wstępu**, wskazuje złożoność budowy oraz wzajemne relacje pomiędzy wieloma typami komórek tworzących niszę, w której rozwija się guz. Doktorantka definiuje pojęcia „zimnego oraz „gorącego” typu nowotworu zwracając uwagę na typy leukocytów, stopień infiltracji tkanki guza oraz dostępne strategie immunomodulujące i przeciwnaczyniowe. W części poświęconej neutrofilom, Doktorantka charakteryzuje poszczególne podtypy komórek związanych z mikrośrodowiskiem nowotworowym (komórki TAN, NDN, LDN oraz MDSC). Czwarta część wstępu zawiera: opis strategii immunoterapeutycznych wykorzystujących punkty kontrolne układu odpornościowego, opis działania ścieżki sygnalizacyjnej cGAS-STING, a także

prezentację dostępnych agonistów białka STING i ich wykorzystanie w trwających obecnie badaniach klinicznych.

Wstęp pracy jest bardzo dobrze napisany oraz zilustrowany wysokiej jakości rycinami (łącznie 6 rycin i dwie tabele). Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na drobne błędy edytorskie i językowe, które znalazły się w tej części pracy. Na przykład: na stronie nr 20 Doktorantka opisuje hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC) oraz ich dalsze etapy różnicowania. Komórki HSC różnicują się w komórki mieloidalne i limfoidalne, a nie w komórki mieloidalne i granulocytarne, jak napisano w pracy; być może jest to wynik zastosowania pewnego skrótu myślowego.

Ponadto, wydaje się niepotrzebne i zbędne, częste stosowanie angielskich odpowiedników nazw komórek, cząsteczek lub mechanizmów, np. siateczka śródplazmatyczna (ang. endoplasmic reticulum), szczepionki przeciwnowotworowe (ang. cancer vaccines), itd. Zwłaszcza kiedy powtórzone są one wielokrotnie; np. „ROS – ang. reactive oxygen species”, „NE - ang. neutrophil elastase”, „aktywacja – ang. priming”. Jednakże dopiero w końcowej części wstępu znajdziemy rozwinięcie skrótowca STING, które powinno znaleźć się już w streszczeniu oraz w abstrakcie, bowiem jest to główny „bohater” niniejszej rozprawy. W tej części pracy autorka niestety nie ustrzegła się użycia pewnego żargonu naukowego, jak przykładowo: „wysoki poziom PD-1”, „poziom występowania punktów kontrolnych”, „normalizacja naczyń krwionośnych”.

Cele pracy, jakie postawiła sobie autorka, są ambitne i klarownie sformułowane.

W rozdziale poświęconym **materiałom i metodom** znajdziemy dokładny opis zastosowanych technik badawczych, szczegółowe tabele z listami odczynników, przeciwciał oraz buforów i roztworów wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych. Ponadto, w niniejszej rozprawie doktorskiej, w badaniach *in vitro* i *in vivo* użyto w sumie 6 linii komórkowych oraz dwa szczepy myszy. Rozdział ten napisany jest przejrzysto, w stosunkowo łatwy do zrozumienia sposób, dodatkowo ilustrowany trzema rycinami przedstawiającymi ogólny schemat prowadzonych doświadczeń.

Zakres stosowanych technik zasługuje na duże uznanie. W badaniach, oprócz standardowych metod badawczych (hodowle komórkowe, Western blotting, barwienia histologiczne), wykorzystano dwa zwierzęce modele nowotworów (do badań *in vivo* - model czerniaka B16-F10 oraz raka sutki 4T1), sortowanie magnetyczne komórek, liczne analizy cytometryczne, a także obrazowanie *in vivo* z wykorzystaniem instrumentu IVIS Lumina XR.

Drobna uwaga: w Rycinie 7 wkraść się angielskie słowo „mice”.

Wyniki oraz Dyskusja, oceniając te obydwa rozdziały łącznie, są poprawnie napisane i odpowiednio prowadzą czytelnika przez meandry otrzymanych danych i mnogość wykorzystanych technik. Całość została zilustrowana ponad 40 schematami, zdjęciami oraz wykresami. Należy zwrócić uwagę, iż wszystkie Ryciny są bardzo wysokiej jakości oraz odpowiednio opisane (podpisy rycin, analiza statystyczna, metodyka) i omówione w tekście. Na uznanie zasługuje bardzo skrupulatne przedstawienie oraz interpretacja wszystkich wyników analiz cytometrycznych i immunocytochemicznych oceniających występowanie

poszczególnych subpopulacji neutrofilii (rozdziały 5 oraz 6). Rozdziały 7 oraz 8 to prezentacja wyników terapii skojarzonych wykorzystujących agonistę STING oraz związek przewnaczyniowy CA4P i przeciwciało anty-PD1 w modelach *in vivo* czerniaka i raka sutka. Ta część wyników doskonale pokazuje biegłość Doktorantki w posługiwaniu się szerokim wachlarzem technik badawczych oraz dużą zdolnością interpretacji wieloetapowych doświadczeń. Co więcej, właśnie w tej finałowej części **Wyników**, w badaniach na modelach zwierzęcych, znajdziemy dowód na użyteczność i skuteczność proponowanych strategii leczniczych.

W wyniku przeprowadzonych badań określono poziom cytotoksyczności stosowanego agonisty STING (2'3'-cGAMP) oraz ilość białka STING w poszczególnych liniach komórkowych. W tym kontekście test MTS (test aktywności mitochondrialnej) służy jako marker żywotności a nie proliferacji, gdyż nigdzie nie oceniano liczby badanych komórek.

Autorka nie wyjaśnia dlaczego nie przeprowadzono badań oceniających aktywację białka STING w komórkach linii CT26 – brak na Rycinie 11. Ponadto, stężenie 10μM agonisty STING zmniejsza żywotność komórek J774A.1. Czy zasadne jest używanie takiego stężenia w tych komórkach?

Niejasne jest także, w jaki sposób w doświadczeniach *in vivo* zoptymalizowano dawkę (5μg/mysz) agonisty STING?

W niniejszym rozdziale autorka niestety nie ustrzegła się stosowania pewnego „slangu” naukowego, nadużywając sformułowań takich jak „poziom białka”, „poziom cytokin”, „medium kondycjonowane”, „neutrofile bramkowane”, „komórki po traktowaniu agonistą” itd.

Niniejszą pracę wieńczy zwięzła, 11-stronnicowa **dyskusja**, gdzie autorka w przystępny sposób analizuje oraz odnosi wyniki swojej pracy do dostępnych danych literaturowych (w sumie ponad 250 pozycji piśmiennictwa). Dyskusja w każdej pracy o charakterze naukowym jest częścią najważniejszą, weryfikującą rzeczywistą znajomość literatury przedmiotu, kompetencje do krytycznej oceny uzyskanych wyników oraz poczynionych obserwacji i prowadzenia prawidłowego wnioskowania. W recenzowanej rozprawie rozdział ten został przygotowany przez Autorkę bardzo dobrze. Rezultaty przeprowadzonych analiz zostały prawidłowo zinterpretowane i zaprezentowane w odniesieniu do światowej literatury. Tak przygotowana dyskusja świadczy o odpowiedniej wiedzy merytorycznej Doktorantki, wysokiej świadomości związanej z wartością naukową przeprowadzonych badań i ewentualnym znaczeniu aplikacyjnym uzyskiwanych rezultatów oraz odpowiednim przygotowaniu w zakresie zaplanowania i wykonania tych bardzo wartościowych eksperymentów.

Przytoczone w części kończącej rozprawę **wnioski** są bardzo konkretne i jasno sformułowane, co niewątpliwie należy uznać za duży walor recenzowanej rozprawy, dający bezpośredni obraz uzyskanych rezultatów i równocześnie ułatwiający odbiorcy zrozumienie najważniejszych aspektów zrealizowanych badań.

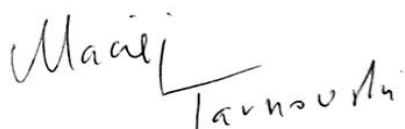
Wniosek

Podsumowując powyższą część mojej oceny stwierdzam, że pod względem wartości merytorycznych niniejsza rozprawa doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom. Przedstawiono w niej bogaty pod względem rozmachu metodycznego, kompletny, bardzo precyzyjnie zaplanowany i rzetelnie wykonany eksperyment naukowy. Potwierdza samodzielność, sprawność warsztatową i pracowitość Doktorantki. Przeprowadzone badania pozwoliły na scharakteryzowanie nowej metody, która w przyszłości i po odpowiedniej weryfikacji może znaleźć zastosowanie w praktyce medycznej. W mojej opinii szczególnie istotnym jest, że dzięki swojej pracy Doktorantka dołożyła cegiełkę do niezwykle ważnej gałęzi współczesnej medycyny, jaką jest immunoterapia nowotworowa.

W mojej ocenie mgr Alina Drzyzga podjęła bardzo ciekawy i ważny temat, zrealizowała postawione sobie cele badawcze, a opanowany warsztat metodyczny świadczy o bogatej wiedzy oraz dojrzałości naukowej. Przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim przewidywane w „Prawie o szkolnictwie wyższym i nauce” – Art. 187. ustawy z dnia 20 lipca 2018 r.

Wszystkie wymienione wcześniej usterki, czy braki nie umniejszają wartości merytorycznej wzmiankowanej rozprawy, której ocena w mojej opinii pozostaje bardzo wysoka, co pozwala na postawienie wniosku do Wysokiej Rady o dopuszczenie Pani Aliny Drzyzgi do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo stawiam wniosek o **wyróżnienie** przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej. Wnioskiem tym chciałbym podkreślić wysoki poziom, jakość i zakres prowadzonych badań oraz rangę rozwiązywanego problemu badawczego.

Z poważaniem



Prof. dr hab n.med. Maciej Tarnowski

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Wydział Nauk o Zdrowiu

Zakład Fizjologii w Naukach o Zdrowiu

Ul Żołnierska 54

70-111 Szczecin