

Recenzja rozprawy doktorskiej pani **Aliny Drzyzgi** pt. „**Wpływ aktywacji białka STING na polaryzację mikrośrodowiska nowotworowego oraz skuteczność terapii przeciwnowotworowej**” przygotowanej pod opieką dr hab. Ryszarda Smolarczyka w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów im. prof. Mieczysława Chorażego w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, oddział w Gliwicach.

Przedmiotem pracy doktorskiej była analiza wpływu aktywacji ścieżki zależnej od białka STING na fenotyp neutrofilów i innych komórek układu immunologicznego obecnych w mikrośrodowisku guza nowotworowego. Białko STING i zależna od niego ścieżka sygnałowa jest istotnym elementem komórkowej odpowiedzi na patogen związanej z mechanizmami *Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP)*. Ścieżka ta ma wpływ na regulację odpowiedzi zapalnej i układu immunologicznego stanowiąc potencjalny cel dla strategii przeciwnowotworowych. Możliwość zastosowania czynników modulujących aktywność ścieżki zależnej od białka STING w kombinacji z innymi czynnikami przeciwnowotworowymi jest obecnie przedmiotem szeregu badań klinicznych. Jednak wiedza o mechanizmach molekularnych i komórkowych, poprzez które deregulacja ścieżki zależnej od białka STING wpływa na fenotyp komórek obecnych w mikrośrodowisku guza nowotworowego jest ograniczona. Temat pracy doktorskiej jest więc nie tylko ciekawy poznawczo, ale ma również potencjalne implikacje praktyczne. Mając na względzie złożoność badanych mechanizmów optymalnym modelem eksperymentalnym jest na obecnym etapie badań wybrany przez Kandydatkę model zwierzęcy, czyli myszy z kompetentnym układem immunologicznym, u których wprowadzono guzy nowotworowe. Ponadto, w swojej pracy Kandydatka wykorzystała metody, które można uznać za złoty standard badań w tym modelu doświadczalnym. Praca doktorska została wykonana w ramach dwóch grantów badawczych finansowanych ze środków NCN: projektu OPUS (2018/31/B/NZ5/01825) kierowanego przez opiekuna pracy oraz projektu PRELUDIUM (2019/35/N/NZ5/02506). Uzyskanie takiego finansowania jest niezależnym potwierdzeniem wysokiej wartości naukowej hipotezy badawczej, która była testowana w badaniach objętych projektem doktorskim Kandydatki.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma typową strukturę. Praca liczy 169 numerowanych stron, zawiera 50 rycin i 19 tabeli, a jej bibliografia odnosi się do 255 poprawnie dobranych pozycji literaturowych. Napisana w języku polskim rozprawa jest w warstwie edytorskiej przygotowana poprawnie, a jej treść jest czytelna i pozbawiona istotnych błędów językowych. Rozprawa poprzedzona jest syntetycznym streszczeniem w języku polskim i angielskim.

Część „Wstęp Teoretyczny” (Rozdział IV) stanowi wprowadzenie do zagadnień będących przedmiotem rozprawy i składa się z czterech podrozdziałów, które w przejrzysty (m.in. dzięki dobrze przygotowanym rycinom) i uporządkowany sposób wprowadzają czytelnika w temat pracy. W tej części Kandydatka m.in. omawia funkcje neutrofilów w mikrośrodowisku guza nowotworowego, strukturę nowotworowych naczyń krwionośnych oraz rolę białka

STING w terapii przeciwnowotworowej. Informacje przedstawione we Wstępie teoretycznym stwarzają racjonalne przesłanki do podjęcia badań i pozwalają zdefiniować Cele pracy przedstawione w rozdziale V.

Uwagi: Nie mam uwag krytycznych do tej części pracy.

Część eksperymentalna pracy składa się z pięciu rozdziałów: Materiały i Metody (VI), Wyniki (VII), Dyskusja (VIII), Wnioski (IX) oraz Bibliografia (X).

W części **Materiały i Metody** Kandydatka omówiła wykorzystany myszy model badawczy, roztwory i odczynniki stosowane w oznaczeniach histochemicznych i immunofluorescencyjnych oraz procedury hodowli komórek, analizy Western blot, oznaczeń cytometrycznych i oznaczeń immunohistochemicznych, a także testy stosowane w analizach statystycznych. Metodyka pracy jest dobrana adekwatnie do postawionych celów badawczych. Poziom szczegółowości opisów jest w większości przypadków wystarczający do powtórzenia doświadczeń przez innego badacza.

Uwagi:

1. Listy zastosowanych przeciwciał zawarte w Tabeli 6 i Tabeli 9 nie zawierają numerów katalogowych i orientacyjnych rozcieńczeń, co utrudnia ew. powtórzenie doświadczeń. Natomiast brak skrótów wykorzystanych później w Tabelach 17 i 18 zmniejsza czytelność danych.
2. W opisie linii komórkowych (podrozdział 3.1) brak odpowiednich numerów identyfikujących daną linię w repozytorium ATCC.
3. W opisie procedur analitycznych brak informacji w jaki sposób uzyskano stabilną temperaturę 21⁰C (wszystkie barwienia immunohistochemiczne).
4. W sekcji 3.4.4. brak informacji w jaki sposób wykrywano monoklonalne mysie przeciwciało pierwszorzędowe anty-HSC70 (Tabela 11).

W części **Wyniki** Kandydatka przedstawiła wyniki analizy wpływu 2'3'-cGAMP (agonista białka STING) na wybrane linie komórkowe *in vitro* (sekcja 1), aktywację i napływ neutrofilów do guza *in vivo* (sekcje 2 i 3), oraz strukturę morfologiczną guzów 4T1 (model raka gruczołu sutkowego) i B16-F10 (model czerniaka) (sekcja 4). Główną część rozdziału stanowią jednak wyniki analizy wpływu 2'3'-cGAMP na fenotyp neutrofilów związanych z nowotworem (TANs) (sekcje 5 i 6) oraz efekty terapii skojarzonej wykorzystującej agonistę STING (2'3'-cGAMP) i związek przeciwnaczyniowy (CA4P) (sekcja 7) oraz terapii skojarzonej cGAMP + CA4P + anty-PD-1 (sekcja 8). Wyniki są przedstawione na czytelnych i poprawnie opisanych rycinach i wykresach. Istotność różnic między porównywanymi grupami jest oceniona za pomocą poprawnie dobranych testów statystycznych. W większości przypadków interpretacja otrzymanych rezultatów jest oparta na dobrze udokumentowanych danych.

Uwagi:

5. Niepoprawne jest określenie analizy z zastosowaniem testu MTS jako analizy „prolifracji” a nie „żywołności” komórek (w dalszej części pracy błąd ten został wyeliminowany).
6. W sekcji 2 brak przekonującego doświadczenia kontrolnego wskazującego, że zwiększona chemiluminescencja luminolu (Ryciny 16 i 17) jest efektem wyłącznie aktywności neutrofilii. Brak tu również próby analizy ilościowej obserwowanego zjawiska. Byłoby to tym bardziej istotne, że mimo podobnego efektu cGAMP na chemiluminescencję w guzach 4T1 i B16-F10 istotnie inny był wpływ cGAMP na migrację neutrofilii do guza w obu tych modelach (nie jest to również omówione w dyskusji pracy).
7. W opisie Rycin 18/19 i Ryciny 21 podobnie podano „Neutrofile bramkowane z populacji komórek żywych 7AD⁻CD11b⁺Ly6G⁺”. Czy Recenzent poprawnie domyśla się, że „odsetek neutrofilii” podany na Rycinach 18/19 to odsetek wszystkich komórek widocznych w analizie cytometrycznej, natomiast „odsetek neutrofilii ICAM-1⁺” podany na Rycinie 21 to odsetek komórek uznanych za neutrofile?
8. W części opisów doświadczeń, w których analizowano zmianę odsetka neutrofilii o danym fenotypie wskazywano na różnicę względną (krotność zmiany, np. sekcja 5.1 i 5.2), a w części różnicę bezwzględną (o x%, np. sekcja 5.3 i 5.4). Może być to mylące ponieważ (przykład z sekcji 5.4, str. 88) różnica o 3% to w tym przypadku różnica 4-krotna. Czy zróżnicowanie tego opisu miało uzasadnienie?
9. Jak Kandydatka uzasadnia stwierdzenie, że zastosowanie terapii skojarzonej cGAMP + CA4P „wykazywało synergiczny efekt terapeutyczny” a nie np. efekt addytywny (sekcja 7.1)?
10. Schemat doświadczeń przedstawionych w sekcji 8 nie pozwala na rzeczywistą ocenę wpływu przeciwciała anti-PD-1 na terapię skojarzoną cGAMP + CA4P, gdyż brak w nich odpowiednich kontroli (np. cGAMP + CA4P bez anti-PD-1). Jednak pośrednie porównanie wyników przedstawionych na Rycinie 31 i Rycinie 49 (guzy 4T1) oraz Rycinie 32 i Rycinie 50 (guzy B16-F10) wskazuje na brak efektów przeciwciała anti-PD-1 na terapię skojarzoną cGAMP + CA4P, na co Kandydatka nie zwraca uwagi w opisie wyników.
11. Biorąc pod uwagę bardzo duży zakres i różnorodność doświadczeń, których wyniki przedstawiono w rozdziale VII, ta część pracy byłaby łatwiejsza w odbiorze, gdyby Kandydatka zaoferowała częściowe podsumowanie po każdej głównej sekcji tego rozdziału.

W części **Dyskusja** (rozdział VIII) Kandydatka omawia swoje wyniki konfrontując je z danymi dostępnymi w literaturze przedmiotu. Sposób poprowadzenia dyskusji wskazuje na dobrą orientację Kandydatki w temacie i znajomość literatury.

Uwaga: (12) Stwierdzenie „komórki śródbłonkowe i makrofagi charakteryzował największy poziom aktywacji białka STING” (oraz podobne stwierdzenia dotyczące produkcji interleukin) powinno być traktowane ostrożnie, ponieważ jest wynikiem eksperymentu z pojedynczymi liniami komórkowymi *in vitro* i nie było potwierdzone *in vivo*.

W części **Wnioski** (rozdział IX) Kandydatka w ośmiu punktach syntetycznie podsumowuje uzyskane wyniki. Punkt dziewiąty („Zbadanie poziomu białka STING oraz fenotypu komórek mikrośrodowiska nowotworowego danego typu nowotworu jest kluczowe dla dopasowania schematu terapeutycznego opartego o aktywację STING”) jest zasadniczo słuszny, jednak trudno uznać że jest to oryginalny wniosek, który można wyciągnąć wprost z analizowanego modelu doświadczalnego.

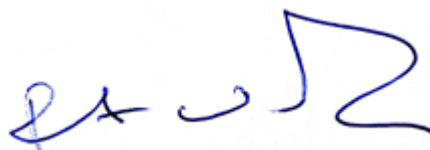
Uwaga: (13) Punkt „Terapia skojarzona agonisty STING, czynnika przeciwnaczyniowego i przeciwciała anti-PD-1 dodatkowo poprawia skuteczność zahamowania wzrostu guzów czerniaka” jest sformułowany w sposób sugerujący istnienie efekt nie udokumentowanego w pracy, gdyż przedstawione wyniki nie potwierdzają zwiększenia efektu terapii cGAMP+CA4P poprzez dodanie przeciwciała anti-PD-1 (uwaga 10).

Podsumowanie.

Recenzowana praca doktorska dotyczy ciekawego zagadnienia o istotnej wartości poznawczej. Doktorantka wykazała się umiejętnościami praktycznymi i wiedzą teoretyczną. Praca jest poprawna formalnie, dobrze zaplanowana i kompetentnie zrealizowana, co świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedstawiona rozprawa doktorska stanowi „oryginalne rozwiązanie problemu naukowego”. Niezależnie od zawartych w recenzji uwag krytycznych przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską pani Aliny Drzyzga oceniam jednoznacznie pozytywnie.

Wniosek końcowy:

W mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 (ust 1-4) Ustawy z dnia 20 lipca 2018r – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz.1668, z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego o kontynuację postępowania o nadanie pani Alinie Drzyzga stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.



prof. dr hab. Piotr Widłak
Gdański Uniwersytet Medyczny