



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY

LABORATORIUM MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ

Warszawa, 11 września 2023 r.

Szanowna Pani
Prof. dr hab. Maria Rapała-Kozik
Przewodnicząca Rady Dyscypliny Nauki biologiczne
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

PANI MGR ANNY MISTARZ

ZATYTUŁOWANEJ: "REPROGRAMMING THE TUMOR MICROENVIRONMENT
IN OVARIAN CANCER BY ONCOLYTIC VIROTHERAPY TARGETING CXCL12
CHEMOKINE/CXCR4 RECEPTOR SIGNALING PATHWAY"

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska podejmuje zagadnienia związane z modulacją mikrośrodowiska nowotworu w mysim syngenicznym modelu raka jajnika. Zaproponowaną przez Doktorantkę interwencją o potencjale terapeutycznym jest dootrzewnowe podanie genetycznie modyfikowanego wirusa krowianki zawierającego gen dla cząsteczki fuzyjnej, zbudowanej z fragmentu łańcucha ciężkiego mysiego przeciwciała klasy IgG2a oraz peptydu będącego agonistą receptora chemokinowego CXCR4, konkurującego o wiązanie jego naturalnego ligandu – chemokiny CXCL12. W swoich badaniach Doktorantka wykorzystuje myszy dzikiego szczepu C57BL/6 oraz transgeniczną linię myszy wyprowadzoną na tle C57BL/6, która w komórkach nabłonkowych jajowodów wykazuje niewielką ekspresję dużego antygenu T wirusa SV40 (skrótowo będę go nazywać antygenem T). Linia ta stanowi, zgodnie ze słowami Doktorantki, model, w którym rozwija się tolerancja immunologiczna wobec tego antygenu. W swoich badaniach Doktorantka porównuje tempo wzrostu in vivo komórek

nowotworowych raka jajnika z ekspresją antygenu T w obu szczepach myszy, bada skład mikrośrodowiska towarzyszącego temu nowotworowi w jamie otrzewnej, a także porównuje skuteczność przeciwnowotworową dwóch rodzajów wirusów onkolitycznych i identyfikuje różnice w składzie komórek zrębu guza i nacieku komórek układu odpornościowego po zastosowaniu wspomnianych wirusów. Wykonane badania są ciekawe, logiczne i wykorzystują liczne metody badania wybranych elementów przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Na wyróżnienie zasługuje także bardzo dobry opis uzyskanych wyników.

Wstęp obejmuje zbiór zagadnień związanych z tematyką pracy, jest zwięzły, choć momentami zbyt uproszczony, co prowadzi do niefortunnych stwierdzeń. Rak jajnika nie jest wiodącą przyczyną zgonu w grupie chorych na nowotwory ginekologiczne – jest nią rak piersi. Opis metod leczenia chorych z rakiem jajnika jest niekompletny. Lepiej byłoby skupić się wyłącznie na zastosowaniu terapeutycznym wirusów onkolitycznych. Bewacyzumab nie hamuje VEGF-A (VEGF-A nie ma aktywności enzymatycznej), lecz go wiąże, uniemożliwiając jego interakcję z receptorem. Pozbawienie wirusa krowianki funkcjonalnego genu dla kinazy tymidylanowej nie sprawia, że ten wirus staje się selektywny wobec komórek nowotworowych – ta modyfikacja nie zmienia przecież powinowactwa wirusa do jego komórkowych receptorów. Sprawia zaś, że tylko w komórkach, w których dochodzi do uruchomienia mechanizmów naprawy DNA, w tym w komórkach nowotworowych wirus ten jest aktywny. Wnika on jednak do wszystkich komórek, które mają dla niego receptor. Według obowiązującej wiedzy komórki dendrytyczne prezentujące antygeny (cDC1 oraz cDC2) pochodzą wyłącznie ze wspólnej komórki progenitorowej limfopoety (CLP) nie zaś z szeregu mielopoety. Ponieważ fenotyp makrofagów jest płynny, poprawne jest stwierdzenie makrofagi o fenotypie M1- lub M2-podobnym, nie zaś makrofagi typu M1 lub M2. Wobec neoantygenów nowotworowych rozwija się obwodowa tolerancja – identyfikowane są limfocyty Treg swoiste właśnie wobec neoantygenów.

Metody doświadczalne wybrane przez Doktorantkę są typowe dla badań tego rodzaju, odpowiednio dobrane i nowoczesne. Nie mam do nich zastrzeżeń. Jednak brak hipotezy badawczej oraz jasno określonych celów badań uniemożliwia mi ocenę kompletności wykonanych doświadczeń. Jaki dokładnie problem naukowy postanowiła rozwiązać Doktorantka? Gdzie w rozprawie został on jasno sprecyzowany? Czy jest

nim walidacja skądinąd bardzo ciekawego modelu mysiego raka jajnika? Czy zbadanie działania przeciwnowotworowego wirusów onkolitycznych? Czy też zbadanie procesów tolerancji antygenów nowotworowych? Bez tej kluczowej informacji nie mogę jednoznacznie ocenić poprawności rozwiązania przez Doktorantkę problemu naukowego.

Dobór testów statystycznych jest, niestety, niepoprawny. Brakuje informacji o tym, czy rozkład uzyskanych danych jest normalny. Gdy w doświadczeniu mamy więcej niż dwie grupy, niepoprawne jest stosowanie do porównań między grupami testu *t* Studenta. Jeśli dane mają rozkład normalny, najczęściej stosowany jest jednokierunkowy test ANOVA z odpowiednim testem typu post-hoc, umożliwiającym porównanie par wybranych grup. W opisie cytometrii przepływowej brak informacji o zastosowanej kompensacji oraz kontrolach znakowań poszczególnymi przeciwciałami [na przykład kontroli FMO (ang. fluorescence minus one) dla znakowań błonowych antygenów, których ekspresja na powierzchni różnych komórek jest ciągła, a nie dyskretna, jak choćby I-A/I-E, CD25 czy F4/80].

Niezrozumiałe jest dla mnie stwierdzenie ze strony 13: „Rozprzestrzenianie się antygenów powodowane wirusoterapią OV-CXCR4-A oraz aktywacja antygeny T SV40 mogą przeprogramować niewrażliwe limfocyty T CD8⁺ skierowane przeciwko komórkom nowotworowym (...)”. Jak może dojść do „aktywacji” antygeny T SV40? Jak można przeprogramować limfocyty T? Co oznacza, że są one niewrażliwe?

Jak można wytłumaczyć obserwację, że deplecja (rozumiem, że chodzi o usunięcie z organizmu) limfocytów T CD8⁺ znosi działanie terapeutyczne wirusów onkolitycznych? Czy naprawdę aktywacja limfocytów T CD8⁺ rozpoznających antygeny nowotworowe jest jedynym mechanizmem działania tej terapii?

Dyskusję uzyskanych wyników oceniam pozytywnie. Pozytywnie oceniam także dobór zacytowanego piśmiennictwa naukowego.

Mimo powyższych uwag krytycznych, których wypunktowanie leży, niestety, w obowiązku recenzenta, stwierdzam, że oceniana przeze mnie rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady o dopuszczenie Pani mgr Anny Mistarz do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednak również z obowiązku recenzenta muszę wyraźnie podkreślić, że brak jasno postawionych celów pracy oraz brak jasno

sformułowanych wniosków z niej płynących znacząco zubaża tę pracę i nie pozwala na ocenę kompletności wykonanych badań.

Dominika Nowis

Prof. dr hab. n. med. Dominika Nowis
Kierownik Laboratorium Medycyny Doświadczalnej
Wydziału Lekarskiego
Warszawski Uniwersytet Medyczny