



20.04.2022

prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska
Zakład Mikrobiologii
Uniwersytet Wrocławski

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani **mgr Agnieszki Szczygieł**
Praca pt. *"Ocena aktywności przeciwnowotworowej chemioimmunoterapii z udziałem nanokoniugatów metotreksatu oraz szczepionek na bazie komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora IL-10"*
wykonana w Zakładzie Onkologii Doświadczalnej
Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
Promotor: dr hab. Elżbieta Pajtasz-Piasecka, prof. PAN

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy bardzo istotnego problemu medycznego, tj. wykorzystywania szczepionek w terapii przeciwnowotworowej. Tematykę i zakres badań ujętych w niniejszej rozprawie należy uznać za innowacyjną i nowatorską. W mojej opinii, badania nad poszukiwaniem nowych sposobów leczenia lub zapobiegania chorobom infekcyjnym, cywilizacyjnym czy nowotworowym są jednymi z ważniejszych wyzwań jakie stawia się obecnie przed lekarzami, genetykami czy biologami molekularnymi i takiego właśnie wyzwania podjęła się Doktorantka w swojej pracy doktorskiej.

Praca prowadzona była pod opieką Pani dr hab. E. Pajtasz-Piaseckiej, prof. PAN od lat pracującej wraz z zespołem nad zagadnieniami roli IL - 10 w modulowaniu odpowiedzi odpornościowej, a także wykorzystaniem komórek dendrytycznych (DC) jako narzędzi terapeutycznych. Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie są kolejnym dopełnieniem tych wieloletnich badań prowadzonych w Zakładzie Onkologii Doświadczalnej Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej i wnoszą nowe, ważne obserwacje. Stanowią też bardzo dobrą podstawę do dalszych badań w tym obszarze, a także dają perspektywy zastosowań w terapii.

Celem pracy było określenie efektu terapeutycznego oraz zmian w odpowiedzi odpornościowej zachodzących pod wpływem zastosowania skojarzonej terapii opartej na nanokoniugacie metotreksatu i hydroksyetyloskrobi oraz komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora IL-10 w mysim modelu raka jelita grubego. Cel pracy został w pełni osiągnięty.

Badania w przedstawionej do recenzji pracy finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu PRELUDIUM, którego tytuł jest tożsamy z tematem pracy doktorskiej. Autorka rozprawy doktorskiej jest także pierwszą autorką pracy

przeglądowej opublikowanej w *Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej* oraz pracy oryginalnej opublikowanej w *Oncology Reports* (IF 3.906).

W rozprawie doktorskiej wyróżniono rozdziały w języku polskim: wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, suplement, piśmiennictwo, oraz spis rycin i tabel, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim.

Wstęp jest bardzo dobrym wprowadzeniem do omówienia wyników eksperymentalnej części pracy. Autorka omawia rolę układu odpornościowego w progresji choroby nowotworowej oraz rolę komórek dendrytycznych w aktywowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej. Istotnym dla tematyki rozprawy doktorskiej jest rozdział, w którym szczegółowo przedstawiono komórki układu odpornościowego obecne w mikrośrodowisku nowotworu i ich rolę w tłumieniu odpowiedzi przeciwnowotworowej, a także rolę IL-10 w tworzeniu odpowiedzi przeciwnowotworowej oraz modulowanie tej odpowiedzi za pomocą chemioterapeutyków. Ogromnym atutem teoretycznej części pracy są bardzo czytelne i klarowne opisy skomplikowanych procesów immunologicznych. Autorka we wstępie pracy umieściła ciekawe schematy, uwaga dotyczy braku legend pod rycinami.

Pytania do tej części pracy:

- We wstępie Autorka pisze, iż spośród obecnie prowadzonych prób klinicznych, wykorzystujących w terapii przeciwnowotworowej komórki dendrytyczne, zdecydowaną większość stanowią badania znajdujące się w I lub II fazie badań klinicznych. Bardzo proszę o uzupełnienie tej wiadomości o kilka przykładów dotyczących konkretnych przykładów badań klinicznych wykorzystujących szczepionki na bazie DC w terapii, ze wskazaniem rezultatów klinicznych tych badań.
- Czy Autorka może podać przykłady badań nad zastosowaniem metotreksatu w badaniach nad komórkami odpornościowymi?

Materiały i metody przedstawione są skrupulatnie i czytelnie. Bardzo czytelne są schematy doświadczeń przygotowane w postaci rycin. Autorka rozprawy opanowała wiele zaawansowanych technik z obszaru biologii molekularnej, immunologii i mikrobiologii.

Pytania i uwagi do tej części pracy:

- Metodyka przedstawiona jest bardzo szczegółowo, jednak nie ma w całym rozdziale odniesień do źródeł. Czy przedstawione w pracy metody są autorstwa Doktorantki, czy bazują na opublikowanych pracach zespołu lub są ich modyfikacją?
- W płynach wykorzystywanych do hodowli komórkowych używane są różne antybiotyki, proszę o uzasadnienie ich wyboru.

- Do stymulacji DC używano lipopolisacharydu, z jakich bakterii pozyskano endotoksynę?
- W metodyce, w której wykonuje się posiewy na podłoża zestalone bardziej poprawnym określeniem jest „posiew powierzchniowy” niż „gładzony”.

Otrzymane wyniki oraz ich omówienie zasługują na wyróżnienie. Oceniam je bardzo wysoko. Doktorantka wykonała imponującą liczbę eksperymentów. Ryciny z wykresami i tabelami, w rozdziale wyniki, są bardzo czytelne i pozwalają na sprawne śledzenie omawianych przez Doktorantkę wyników, a także pozwalają na precyzyjne wyciąganie wniosków. Wyniki zasadniczo ujęte są w pięć podrozdziałów. W pierwszej części omówiony został wpływ metotreksatu (MTX) oraz nanokoniugatu metotreksatu i hydroksyetyloskrobi (HES-MTX) na zahamowanie proliferacji komórek linii nowotworowych, następnie omówiono efekt przeciwnowotworowy chemioterapii. Kolejnym krokiem w badaniach było określenie efektu przeciwnowotworowego chemioimmunoterapii z udziałem MTX lub HES-MTX oraz szczepionek komórkowych na bazie dojrzałych komórek dendrytycznych oraz aktywności komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora dla IL-10, by finalnie badać efekt przeciwnowotworowy z udziałem MTX lub HES-MTX oraz szczepionek komórkowych na bazie dojrzałych komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora IL-10. Autorka bardzo trafnie podsumowuje kolejne części pracy i przechodzi do omawiania kolejnych. Układ jest spójny i bardzo logiczny. Jestem pod dużym wrażeniem jak sprawnie i czytelnie udało się Doktorantce przedstawić tak ogromną liczbę uzyskanych wyników. Bardzo dobrym rozwiązaniem, przy takiej mnogości danych do omówienia, jest także przygotowanie podsumowań po każdym dużym podrozdziale pracy. Wśród wielu cennych obserwacji, w mojej opinii, końcowy wniosek wysunięty przez Doktorantkę trafnie podsumowuje całość badań, dając podstawy do dalszych eksperymentów i zastosowań terapeutycznych. Autorka wskazuje, iż biorąc pod uwagę uzyskane wyniki po podaniu nanokoniugatu doszło do wytworzenia właściwej niszy środowiskowej, umożliwiło to rozwój skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej zainicjowanej przez komórki dendrytyczne o obniżonej wrażliwości na IL-10. Autorka rozprawy określiła także dawkę nanokoniugatu, prowadzącą do spowolnienia wzrostu guzów oraz modulującą odpowiedź odpornościową, która stwarza korzystne warunki do inicjowania odpowiedzi przeciwnowotworowej przez podane szczepionki na bazie DC/TA_g. Także transdukcja lentiwirusowa sekwencją shIL-



10R_1 prowadziła do efektywnego obniżenia ekspresji receptora IL-10 w DC, a to zmniejszało ich wrażliwość na wpływ IL-10.

Dyskusja poprowadzona jest prawidłowo i dojrzałe. Proszę natomiast Doktorantkę, aby przedstawiła perspektywy dalszych badań dla przedstawionych we własnej rozprawie doktorskiej wyników. Jakie Doktorantka widzi perspektywy zastosowań klinicznych otrzymanych wyników?

Podsumowując stwierdzam, iż rozprawa doktorska pt. *"Ocena aktywności przeciwnowotworowej chemioimmunoterapii z udziałem nanokoniugatów metotreksatu oraz szczepionek na bazie komórek dendrytycznych z wyciszoną ekspresją receptora IL-10"* została dobrze zaplanowana i wykonana. Uzyskano w niej bardzo interesujące i ważne naukowo wyniki. Mgr Agnieszka Szczygieł wykazała się nie tylko umiejętnościami w zakresie planowania koncepcji pracy, wykonania szeregu eksperymentów, ale także trafnością wnioskowania i umiejętnością bardzo przejrzystego prezentowania otrzymanych wyników. Dodatkowo Doktorantka zdobyła finansowanie na badania, jest pierwszą Autorką zarówno pracy eksperymentalnej, jak i przeglądowej. Są to niezwykle ważne osiągnięcia Doktorantki.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, iż rozprawa doktorska mgr Agnieszki Szczygieł spełnia warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz.595, z późn.zm.). Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu z prośbą o dopuszczenie mgr Agnieszki Szczygieł do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska