

Prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski
Katedra i Zakład Immunologii Medycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny
Ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk
Tel. 058 3491590, 058 3491593
Fax 058 3491591
e-mail: ptrzon@gumed.edu.pl

Gdańsk 23.06.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej magister inżynier Olgi Sokolowskiej: „Ocena potencjału przeciwnowotworowego białka stymulującego geny dla interferonów (STING) – białka adaptorowego uczestniczącego w indukcji nieswoistej odpowiedzi immunologicznej”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska to praca doświadczalna, której celem było zbadanie działania przeciwszpiczakowego połączenia bortezomibu z podaniem agonisty STING. Badana kombinacja leków wykazała działanie cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych i doprowadziła do indukcji śmierci komórek *in vitro*. Skuteczność terapii zweryfikowano następnie *in vivo* w mysim modelu szpiczaka plazmocytozy $V\kappa^*MYC$, gdzie skutecznie hamowała ona rozwój choroby i wydłużała istotnie przeżycie zwierząt ze szpiczakiem plazmocytozy. Włączenie przeciwciała anti-PD1 dodatkowo zwiększało skuteczność tej terapii. W zakresie wpływu na układ odpornościowy terapia indukowała wydzielanie cytokin prozapalnych oraz zwiększenie odsetka neutrofilii, aktywowanych komórek dendrytycznych oraz limfocytów T w śledzionie badanych myszy, a efekty te zależne były od aktywacji ścieżki zależnej od białka STING.

Głównym wnioskiem pracy jest potwierdzenie skuteczności terapii z zastosowaniem bortezomibu i agonisty STING w leczeniu szpiczaka plazmocytozy.

Praca ma układ klasyczny. Rozpoczyna ją Wstęp, w którym Doktorantka w sposób szczegółowy omawia rolę odporności wrodzonej w odpowiedzi immunologicznej ze szczególnym uwzględnieniem białka STING oraz przedstawia obraz klinicznego przebiegu i leczenia szpiczaka plazmocytozy wraz ze szczegółowym omówieniem podstaw biologicznych tej choroby. Uważam, że rozdział jest napisany przystępnym językiem z wykorzystaniem najnowszej literatury. Sposób prezentacji pozwala w pełni zrozumieć miejsce STING w komórce oraz w odpowiedzi odpornościowej. Kolejnym rozdziałem są Materiały i Metody, w którym Doktorantka przedstawiła szczegółowo stosowaną metodologię. Dobór metod uważam za właściwy do zaproponowanego celu pracy. Użyte

techniki są nowoczesne i pozwoliły odpowiedzieć na zadawane w pracy pytania badawcze. Kolejną częścią pracy są Wyniki. Pomimo dużej ilości rezultatów Autorka przedstawiła je w sposób czytelny rozpoczynając od analizy ekspresji białka STING i jego aktywatorów w komórkach chorych na szpiczaka i w liniach komórkowych wyprowadzonych z tego nowotworu. Następnie, przeanalizowała działanie bortezomibu i agonistów STING na komórki linii szpiczaka, tj. ustaliła dawki związków do dalszych eksperymentów, potwierdziła mechanizm działania (w szczególności szlaki aktywacji apoptozy) oraz synergizm w przypadku terapii łączonej. Następnie Autorka potwierdziła swoje obserwacje z komórkami linii szpiczakowej Vk*MYC pozbawionej ekspresji STING, które zastosowała także w modelu zwierzęcym szpiczaka. Dzięki zastosowaniu komórek Vk*MYC możliwe było śledzenie efektu aktywacji STING jedynie w komórkach gospodarza. W modelu tym Doktorantka udowodniła, iż jedynie łączne podanie bortezomibu z agonistą STING może wywołać częściową remisję choroby z istotnie dłuższym przeżyciem chorych zwierząt. Drugim modelem, w którym testowano terapię był myszy model raka jajnika ID8 (komórki także pozbawione ekspresji STING). Wykazano, iż bortezomib w terapii łączonej pogarsza wyniki leczenia agonistą STING, co świadczy o specyficzności strategii leczenia łączonego jedynie wobec szpiczaka. Doktorantka określiła także możliwy mechanizm działania agonistów STING na układ odpornościowy leczonych zwierząt. Ustaliła, że w trakcie leczenia dochodzi do wydzielania istotnych ilości cytokin prozapalnych, zwiększenia ilości komórek dendrytycznych i granulocytów obojętnochłonnych. Terapia aktywowała także limfocyty T badanych zwierząt. Wreszcie, Doktorantka przeanalizowała efekt terapii trójlekowej z bortezomibem, agonistą STING i inhibitorem PD1 wykazując istotnie dłuższe przeżycie zwierząt leczonych w grupie poddanej terapii trójlekowej. Kolejnymi rozdziałami są Dyskusja i Wnioski, w których Autorka w sposób przekonywujący zinterpretowała uzyskane wyniki. Użyta literatura podobnie jak we Wstępie jest adekwatna i w pełni popiera wnioski wysnute przez Doktorantkę.

Czytałem pracę z bardzo dużą przyjemnością i wzbudziła we mnie naukową ciekawość, dlatego pozwoliłem sobie na kilka pytań:

1. Autorka w pracy najpierw potwierdziła działanie terapii łączonej, w szczególności agonistów STING, na komórki szpiczaka, a następnie zastosowała model *in vivo*, w którym agonista STING wpływał wybiórczo na zdrowe komórki gospodarza (wybrana linia szpiczakowa nie wykazywała ekspresji STING). Jakie wg Autorki byłyby wyniki

gdyby zastosować model odwrotny, tj. testowanie leczenia na linii szpiczakowej z ekspresją STING w zwierzętach z knockoutem STING?

2. Klasycznym sposobem ustalenia dawki badanych związków do dalszych testów jest analiza LD50 (np. dla komórek innego pochodzenia niż szpiczak jako odpowiednika komórek zdrowych) i ED50 (jako stężenia skutecznego wobec komórek szpiczaka). W ten sposób można ocenić specyficzność efektu wobec komórek docelowych oraz dostosować dawkę do wykazywanej toksyczności wobec komórek zdrowych. Szczególnie że model *in vivo* zakładał izolowane działanie agonistów STING na zdrowe komórki gospodarza. Dlaczego ten sposób analizy nie został uwzględniony w pracy? Podobnie w modelu *in vivo* nie znalazłem opisu toksycznych działań zastosowanej terapii i ich odniesienia do zastosowanych dawek i stężenia związków w surowicy zwierząt poddanych terapii. Czy zastosowane dawki pozwalały uzyskać stężenia związków w surowicy porównywalne do tych stosowanych *in vitro*? Jak bardzo toksyczny efekt związków mógł maskować rzeczywistą efektywność związków (czy zbyt duża dawka mogłaby wpłynąć na dużą śmiertelność zwierząt)?
3. Czy właściwe było wykorzystanie genu dla Beta 2 mikroglobuliny jako genu referencyjnego w badaniach linii szpiczakowych (rozdział 7.2.1.1, 7.2.2.2) biorąc pod uwagę, że ilość produktu tego genu jest w szpiczaku relatywnie duża i wykorzystywana wręcz jako marker diagnostyczny progresji tej choroby? Czy referencją był *B2M* czy *RPL29*?
4. Czy w doświadczeniach z antagonistą PD1 stosowano kontrole z monoterapią antyPD1? Skąd wiadomo, że obserwowany efekt nie jest wynikiem działania jedynie antyPD1?

W odniesieniu do technicznych aspektów pracy chciałbym zapytać o dwa elementy:

1. Opis immunofenotypowania wielokolorowego nie zawiera opisu stosowanych kontroli (kontrole izotypowe, fenotypowanie minus jeden kanał?) oraz sposobu ustalenia wysycającego stężenia przeciwciał do barwienia (miareczkowanie?).
2. Kilka wykresów w pracy przedstawia średnie i SEM. Bardziej właściwe byłoby konsekwentne przedstawianie średniej i SD.

Konkludując, uważam pracę za bardzo pożyteczną i niosącą duży wkład do naszego rozumienia szpiczaka i sposobów jego leczenia. Zastosowane metody i uzyskane wyniki pozwalają na dalszy rozwój tego pomysłu do badań klinicznych włącznie. Na uwagę zasługuje także szeroki wachlarz przeprowadzonych badań i zapewne bardzo duży wkład pracy Autorki w przeprowadzenie tych eksperymentów.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2016 poz. 882 z późn. zm.) i wnioskuję o dopuszczenie magister inżynier Olgi Sokołowskiej do dalszych części przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie pracy ze względu na jej wartości merytoryczne i warsztatowe. Na szczególną uwagę w pracy zasługuje rzeczowy sposób udowodnienia stawianych hipotez poprzez bardzo adekwatnie dobrane prace eksperymentalne. Dzięki rozbudowanemu warsztatowi laboratoryjnemu Doktorantka udowodniła *in vitro* i *in vivo*, że postulowana terapia łączona może poprawić wyniki leczenia szpiczaka. Praca w znakomity sposób połączyła wiedzę o działaniu układu odpornościowego i biologii szpiczaka z perspektywą terapeutyczną. To przykład translacyjnego podejścia jakiego powinniśmy sobie życzyć w każdej pracy doktorskiej z dziedziny nauk medycznych.

K I E R O W N I K
Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny


prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski