

Łódź, dn. 2 czerwca 2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Pilanc-Kudlek
„Wpływ inhibitora arginazy oraz peptydu RGD
na mikrośrodowisko nowotworu i odpowiedź na immunoterapię
z użyciem przeciwciała anty-PD-1 w mysim modelu glejaka”

Praca doktorska mgr Pauliny Pilanc-Kudlek została wykonana w Pracowni Neurobiologii Molekularnej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod kierunkiem prof. dr hab. Bożeny Kamińskiej-Kaczmarek oraz promotora pomocniczego dr Aleksandry Ellert-Miklaszewskiej. Celem badań było opracowanie i scharakteryzowanie efektywności nowych opcji terapeutycznych w złośliwym glejaku z użyciem i) OAT-1746 - nowego, selektywnego, małowcząsteczkowego inhibitora arginazy 1 oraz ii) RGD - krótkiego peptydu blokującego oddziaływanie SPP1-integryny jako strategii reaktywacji przeciwnowotworowej odpowiedzi i uwrażliwienia guza na działanie przeciwciała anty-PD-1.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, przygotowana w języku polskim, obejmuje łącznie 117 stron maszynopisu i przyjęła formę pracy monograficznej podzielonej na 7 rozdziałów: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski oraz Piśmiennictwo. W recenzowanej rozprawie doktorskiej znajduje się ponadto Wykaz skrótów i symboli, streszczenia w języku polskim i w języku angielskim oraz Spis publikacji z udziałem Doktorantki. W rozprawie Doktorantka powołuje się na opinię Lokalnej Komisji Etycznej Nr 1 w Warszawie, jednak opinia nie została dołączona.

Praca przygotowana została starannie, choć Doktorantka nie ustrzegła się paru literówek i pomyłek językowych (np. „Abstrakt” zamiast „Abstract”, „barrier” zamiast „barrier”, „bałko” zamiast „białko”). Niemniej jednak te drobne pomyłki nie wpływają na ocenę merytoryczną pracy, tym bardziej, że większość wynika najprawdopodobniej z „samowoli” edytora tekstu.

We Wstępie Doktorantka wprowadza i omawia kluczowe dla wykonanych badań pojęcia i zagadnienia, w tym m.in. klasyfikację i epidemiologię glejaków, dostępne obecnie strategie terapeutyczne, a także analizuje problemy i wyzwania dla współczesnej medycyny wynikające ze specyfiki, w tym immunosupresyjnej, mikrośrodowiska glejaków. Doktorantka dyskutuje również podstawy immunoterapii glejaków. Wskazuje również na nowe, potencjalne cele terapeutyczne, którymi – jako nowymi *targetami* w leczeniu glejaków – będzie się zajmować eksperymentalnie (hamowanie aktywności arginazy, blokowanie pochodzącej z glejaka Spp1 za pomocą trójpeptydu RGD). Wstęp jest prawidłowo skonstruowany, a Doktorantka w interesujący sposób omawia prezentowane zagadnienia. W mojej opinii można by dodatkowo przedyskutować przyczyny niskiej skuteczności walidowanej wcześniej immunoterapii glejaka (badanie CheckMate), a także

przeanalizować z większą uwagą kwestię obserwowanego w badaniach zwiększenia ekspresji arginazy zarówno w komórkach nowotworowych, jak i układu odpornościowego. W wybranych przypadkach, tj. gdy blokowanie arginazy jest niespecyficzne, efekt przeciwnowotworowy i promujący karcynogenezę mogą się równoważyć (znosić), co może negatywnie wpłynąć na efektywność terapii przeciwnowotworowej.

Cel pracy i szczegółowe cele badawcze zostały jasno sprecyzowane: Doktorantka podjęła próbę oceny przeciwnowotworowego działania inhibitora arginazy (OAT-1746) oraz peptydu interferującego RGD, a także ich wpływu na mikrośrodowisko i odpowiedź na immunoterapię w mysim glejaku GL261. Co istotne, charakteryzowane strategie terapeutyczne były również łączone z przeciwciałami anty-PD-1.

W rozdziale Materiały i metody Doktorantka przedstawiła bardzo szeroki zakres metod doświadczalnych, którymi posługiwała się by osiągnąć obrane cele naukowe. Warto podkreślić, że warsztat eksperymentalny obejmuje interesujący i dobrze zwalidowany model zwierzęcy glejaka, który stał się źródłem materiału biologicznego dla szeregu oznaczeń, w tym obrazowania metodami bioluminescencyjnymi, rezonansu magnetycznego i immunofluorescencyjnymi oraz prowadzonych z użyciem zaawansowanych technik biomolekularnych, takich jak sekwencjonowanie RNA. W kontekście tak obszernego warsztatu badawczego warto poruszyć następujące kwestie: 1. Dlaczego model opiera się wyłącznie na samcach, a nie samcach i samicach myszy?; 2. Ponieważ nie jest znana struktura i charakterystyka właściwości fizykochemicznych związku OAT-1746, w rozdziale 6.2.3. warto by podkreślić, że implantacja pomp osmotycznych dotyczy jedynie zwierząt traktowanych RGD. 3. Dlaczego nie zastosowano - dla porównania skuteczności - innego, dostępnego komercyjnie inhibitora arginazy równolegle ze związkiem OAT-1746? 4. Czy modyfikacja sekwencji RGD i RAE poprzez acetylację na końcu C i amidację na końcu N nie wpłynęła na ich aktywność na poziomie komórki (czy była jakakolwiek kontrola tej aktywności?). 5. Chciałbym również zapytać, czy podanie doguzowe, w sposób ciągły, odpowiada warunkom klinicznym (tj. w leczeniu człowieka)?

W rozdziale Wyniki Doktorantka przedstawia uzyskane dane doświadczalne, wzbogacając tekst pisany właściwie dobranymi i odpowiednio przygotowanymi rycinami i tabelami. Co ciekawe, Doktorantka zaobserwowała, że podawanie OAT-1746 nie wpłynęło na wielkość guzów w porównaniu z grupą kontrolną, jednak profil transkryptomiczny komórek CD11b+ izolowanych z guzów u zwierząt otrzymujących OAT-1746 wskazywał na zmniejszoną ekspresję genów zaangażowanych we wspieranie nowotworu. Jednocześnie, inhibitor arginazy hamował nabywanie immunosupresyjnego fenotypu przez komórki mieloidalne w guzie, a w kombinacji z przeciwciałem anty-PD-1 redukował wzrost glejaka u myszy. Z kolei podawanie peptydu RGD nie wpływało na wielkość guza, ale hamowało nagromadzenie w mikrośrodowisku nowotworu mikrogleju/makrofagów o proinwazyjnym fenotypie. Zmiany transkryptomiczne wskazały na przeprogramowanie komórek CD11b+ związanych z nowotworem po podaniu peptydu RGD oraz silną indukcję odpowiedzi prozapalnej po podaniu anty-PD-1, zwłaszcza w kombinacji z peptydem. Ponadto,

jednoczesne podanie RGD oraz anty-PD-1 prowadziło do zwiększonego napływu limfocytów T cytotoksycznych, zmniejszenia odsetka limfocytów regulatorowych oraz spowolnienia wzrostu guza.

W opinii recenzenta warto, w kontekście prezentowanych wniosków, zastanowić się nad następującą kwestią: Doktorantka twierdzi, że „podawanie OAT-1746 prowadziło do wzrostu stężenia L-argininy, zarówno w mózgu (Rycina 3B), jak i w osoczu krwi (Rycina 3C), co wskazuje na zahamowanie rozkładu L-argininy przez arginazę w wyniku działania inhibitora”. Pamiętajmy jednak, że oznaczenia prowadzono w homogenacie otrzymanym z całego mózgu, zatem nie można określić w których dokładnie komórkach czy tkankach doszło do zmian aktywności enzymu pod wpływem związku.

W rozdziałach Dyskusja oraz Podsumowanie i wnioski Doktorantka omawia najważniejsze obserwacje i osiągnięcia badawcze. Dyskusja jest niezwykle interesująca i umiejętnie prowadzona przez Doktorantkę. Podobnie jak w przypadku wcześniejszych rozdziałów, warto by odnieść się do kilku istotnych kwestii, m.in.: Doktorantka wskazuje, że ARG1, jako marker immunosupresyjnych komórek mieloidalnych, ulega wysokiej ekspresji w GAMs, głównie w makrofagach pochodzących z naciekających z obwodu monocytów, a w mniejszym stopniu w rezydentnym mikrogleju. Czy w takim razie wysoka ekspresja białka koreluje z jego aktywnością enzymatyczną? Należy pamiętać, że OAT-1746 nie reguluje ekspresji, a aktywność enzymu. Nasuwa się również pytanie – czy miałoby sens podanie wszystkich trzech (potencjalnych) terapeutyków, tj. OAT-1746, RGD i anty-PD-1? Chciałbym również zwrócić uwagę na rozdział 8.4. Perspektywy, wyzwania i krytyczna ocena możliwości użycia badanych strategii terapeutycznych w praktyce klinicznej, jako niezwykle ciekawą próbę wytyczenia kierunków dalszych badań i ścieżek eksperymentalnych w podjętej tematyce.

Podsumowując - niezależnie od wyżej poruszonych kwestii i postawionych pytań stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Pauliny Pilanc-Kudlek spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Doświadczalnej PAN o dopuszczenie mgr Pauliny Pilanc-Kudlek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Ze względu na wysoki poziom merytoryczny recenzowanej rozprawy doktorskiej oraz duże znaczenie uzyskanych wyników dla reprezentowanego obszaru nauki wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy. Gratuluję Doktorantce oraz Paniom Promotor niezwykle interesującej rozprawy!

KIEROWNIK
Zakładu Biochemii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Prof. dr hab. n. med. Jakub Fichna

Warszawa, 17/06/2025

RECENZJA rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Pilanc-Kudlek pt. „Wpływ inhibitora arginazy oraz peptydu RGD na mikrośrodowisko nowotworu i odpowiedź na immunoterapię z użyciem przeciwciała anti-PD1 w mysim modelu glejaka”

Recenzowana praca dotyczy badań nad rolą mikrośrodowiska nowotworu i jego immunosupresyjnego wpływu w glejaku złośliwym. Celem pracy było opracowanie nowych terapii, które poprzez przeprogramowanie komórek mieloidalnych w guzie mogłyby się przyczynić do poprawy skuteczności immunoterapii opartych o przeciwciała anti-PD-1. W pracy doktorantka zastosowała dwa podejście terapeutyczne: poprzez blokowanie arginazy za pomocą drobnocząsteczkowego inhibitora Agr-1 oraz zablokowanie białka SPP1 za pomocą peptydu RGD blokującego oddziaływanie SPP1 z integrynami. Obie strategie są ciekawym i innowacyjnym podejściem do terapii glejaków polegającym na reaktywacji przeciwnowotworowej odpowiedzi i uwrażliwieniem guza na działanie przeciwciał anti-PD-1 i stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona rozprawa doktorska ma typowy układ monografii naukowej, składa się z 6 standardowo ułożonych głównych części (wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski) popartych 152 pozycjami piśmiennictwa. Cele pracy są sformułowane przejrzysto, obejmują 6 szczegółowych celów badawczych.

Ocena merytoryczna

Wstęp w wystarczający sposób wprowadza czytelnika w tematykę prowadzonych badań. Jest napisany w sposób klarowny i przystępny, świadczy o dużej ogólnej wiedzy teoretycznej doktorantki. Pojawiło się w nim jednak kilka drobnych nieścisłości. Na przykład w paragrafie o immunoterapiach biernych wymienione są cytokiny, a nie jest to terapia bierna tylko czynna. Na stronie 29 – stwierdzenie „PD-L1 ulega stałej ekspresji na limfocytach” jest nieprawidłowe, ponieważ ekspresja PD-L1 na limfocytach zmienia się zależnie od ich stanu aktywacji. Na schemacie 3 podpisano limfocyty jako nieaktywne i aktywowane, podczas gdy PD-1 ulega ekspresji na limfocytach aktywowanych. Precyzyjniejszy podpis ryciny mógłby być następujący: „Związanie PD-L1 i/lub PD-L2 z receptorem PD-1 powoduje zahamowanie przekazywania

sygnałów aktywujących limfocyty T. Przeciwciała anti-PD-1 przyczyniają się do wzmocnienia cytotoksyczności limfocytów T i zwiększonej produkcji cytokin”. Wymienione nieścisłości nie wpływają znacząco na jakość przekazu informacji, a cały wstęp jest napisany bardzo przystępnym językiem i tworzy logiczną całość.

Głównym celem pracy było przeprogramowanie komórek mieloidalnych w guzie, które mogłoby się przyczynić do poprawy skuteczności immunoterapii opartych o przeciwciała anti-PD-1. Ważnym etapem prac była walidacja testowanych strategii w in vivo oraz charakterystyka mikrośrodowiska glejaka po podaniu inhibitora Arg-1 (OAT-1746) lub peptydu RGD wykorzystując wieloparametryczną analizę cytometrii przepływowej oraz profilowanie transkryptomiczne (RNAseq) izolowanych komórek CD11b+. Doktorantka oceniała skuteczność przeciwnowotworową immunomodulatorów w monoterapii oraz w połączeniu z blokadą PD-1.

Aby osiągnąć zamierzone cele doktorantka wykonała cały szereg eksperymentów, zarówno in vitro jak in vivo. Prowadząc szeroko zakrojone badania doktorantka wykazała się imponującą znajomością wielu metod eksperymentalnych. W celu oceny skuteczności proponowanych strategii terapeutycznych doktorantka zastosowała ortotopowy model glejaka polegający na implantacji komórek glejaka do mózgu myszy. Monitorowanie wzrostu guza odbywało się za pomocą bioluminescencji oraz metodą rezonansu magnetycznego. Objętość guza wyznaczano także na podstawie histologicznej oceny skrawków mózgu. Podawanie substancji terapeutycznych również wymagało od doktorantki opanowania dodatkowych metod eksperymentalnych. Inhibitor arginazy był podawany dożołądkowo 2 razy dziennie, natomiast peptyd RGD był podawany w pompie osmotycznej dozującej substancję w sposób stały i wymagającej implantacji w okolicy karku myszy. Tkanka mózgowa była również przygotowywana przez doktorantkę do dalszych analiz cytometrycznych obejmujących analizę komórek przy pomocy wielokolorowych paneli oraz sortowanie komórek mieloidalnych, jak i do transkryptomicznych obejmujących przygotowanie bibliotek. W celu oceny skuteczności leku doktorantka oznaczała stężenia argininy, inhibitora Arg-1 OAT -1746 w osoczu oraz homogenatach mózgów, a także stabilność peptydu RGD. Badania prowadzone na zwierzętach były dość skomplikowane i wymagające, jeśli chodzi o procedury eksperymentalne, wymagały także ogromnego zaangażowania czasowego i świetnej organizacji pracy.

Analiza wyników wykazała, że doustne podawanie OAT-1746 nie miało wpływu na skład komórek układu odpornościowego w mikrośrodowisku glejaka, jednak indukowało zmiany transkryptomiczne w komórkach CD11b+ z mózgu myszy otrzymujących ten inhibitor. Z kolei w badaniach nad podawanym doguzowo peptydem RGD doktorantka wykazała, że peptyd RGD

skutecznie blokował przeprogramowanie komórek mikrośrodowiska w kierunku fenotypu wspierającego glejaka, jednak nie wpływał na wielkość guza. Zastosowanie peptydu RGD w połączeniu z przeciwciałem anti-PD-1 zmieniało skład i funkcjonalność komórek układu odpornościowego i doprowadziło do zmniejszenia wielkości guza. Otrzymane wyniki wskazują, że testowane przez doktorantkę strategie zmieniają mikrośrodowisko glejaka i wykazują potencjał modulowania odpowiedzi układu odpornościowego.

Analiza przedstawionej pracy doktorskiej wskazuje, że doktorantka bardzo sprawnie posługuje się wieloma metodami biologii molekularnej, dobrze dobiera metody badawcze do realizacji założonych celów, jest dobrze zorientowana w tematyce badawczej, która się zajmuje oraz prowadzi badania, których wyniki stanowią istotny wkład w poszerzenie aktualnej wiedzy na temat roli układu odpornościowego i modulowania jego aktywności w eliminacji komórek nowotworowych. Wykonując zaplanowane eksperymenty doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej na najwyższym poziomie. W trakcie lektury rozprawy doktorskiej nasunęło mi się jednak kilka pytań i komentarzy.

Komentarze i pytania

1. Jeśli stwierdzono (Ryc. 1), że ekspresja Arg-1 i Arg-2 występuje głównie w komórkach nowotworowych to dlaczego w kolejnych eksperymentach z mysim glejakiem nie oceniono ekspresji Arg-1 również w komórkach nowotworowych?
2. Czy OAT -1746 wykazuje taką samą skuteczność w hamowaniu ludzkiej i mysiej Arg-1? Czy było to badane i czy można się spodziewać jakiś różnic w działaniu inhibitora pod tym względem?
3. Przy pomiarach OAT -1746 w osoczu i mózgu (Ryc. 3A) nie ma żadnej kontroli. Czy nie jest zaskakujące dla doktorantki tak wysokie stężenie OAT -1746 w mózgu w porównaniu z osoczem? Jak uzyskano pomiar stężenia w jednostkach μM w homogenacie z mózgu – czy stężenie było przeliczane na białko? Jeśli nie, to jaki wpływ miała objętość płynu, w którym dokonywano homogenizacji? Porównanie na jednym wykresie stężenia w osoczu i homogenacie mózgu bez odpowiednich kontroli jest mylące.
4. Jaką przewagę czy zalety ma metoda histologicznej oceny guza nad pomiarem luminescencji lub rezonansem magnetycznym? Dlaczego taka metoda została zastosowana?
5. Stężenie argininy w homogenacie mózgu nie świadczy o zwiększeniu stężenia argininy w płynie zewnątrzkomórkowym, czyli tej dostępnej potencjalnie dla limfocytów T. Świadczy

o zwiększeniu stężeniu argininy w homogenacie, czyli także wewnątrz komórek, m.in. komórek nowotworowych. Czy można by zmierzyć stężenie argininy w płynie zewnątrzkomórkowym, która powinna mieć kluczowe znaczenie dla możliwości spotęgowania działania cytotoksycznego limfocytów.

6. Rycina 4 – dlaczego liczebność grupy kontrolnej i grupy otrzymującej OAT -1746 wynosiła 12 myszy, a grupy otrzymującej anty-PD1 tylko 5? Przy $n=5$ trudno ocenić prawdziwość twierdzenia, że połowa myszy odpowiada na terapię, a połowa nie. Dlaczego barwień na obecność limfocytów T dokonano tylko dla 4 myszy z grupy anty-PD1 (Ryc. 5B)?
7. Rycina 6C – gdzie są pokazane wyniki ANOVY wskazujące na to, że kombinacja OAT -1746 i anty-PD1 opóźniała wzrost guza? Na rycinie 6B powinny być przedstawione obrazy BLI wszystkich myszy – wtedy łatwiej można ocenić różnice międzyosobnicze oraz faktyczny wpływ testowanych leków na rozwój glejaka. Na podstawie wyników przedstawionych na Ryc. 6B/C nie można stwierdzić, czy kombinacja znacząco zmniejszała wzrost guza.
8. Ocena poziomu cytokin po podaniu OAT oraz anty-PD1 w osoczu jest mało miarodajna jako odzwierciedlenie procesu toczącego się w mózgu.
9. Ocena profilu transkryptomicznego komórek CD11b – dlaczego w tych komórkach zwiększyła się ekspresja genów kodujących białka powierzchniowe komórek NK oraz geny typu perforyna, granzym A, jeśli nie była to analiza w komórkach NK? Podobnie przy analizie profilu transkryptomicznego komórek CD11b u myszy otrzymujących peptyd RGD - dlaczego w tych komórkach zwiększyła się ekspresja genów kodujących granzym A i B, czy podjednostkę beta IL2R, jeśli nie były to komórki NK ani limfocyty T? Czy mogło to wynikać z zanieczyszczenia populacji komórek CD11b podczas sortowania?
10. Jeśli po podaniu peptydu RGD zaobserwowano przeprogramowanie komórek CD11b, a nie zaobserwowano zmian w wielkości guzów, to czy nie wskazuje to pośrednio, że rola przeprogramowania komórek CD11b nie jest szczególnie istotne dla procesu wzrostu glejaka?
11. Rycina 15B – w grupie traktowanej przeciwciałem anty-PD1 nie widać podziału na myszy odpowiadające i nieodpowiadające na terapię – jakie parametry zmieniły się w stosunku do eksperymentu z Ryc. 4, w którym zaobserwowano różne odpowiedzi myszy na terapię anty-PD1?
12. Strona 80 – błędne stwierdzenie – w kontekście MHC kl. II antygen rozpoznają limfocyty CD4, a nie CD8.



Powyższe komentarze i pytania nie umniejszają charakteru osiągnięcia naukowego mgr Pauliny Pilanc-Kudlek. Oceniam je bardzo wysoko jako mające istotny wkład w zrozumienie roli modulowania mikrośrodowiska nowotworowego i potencjalnego zastosowania takich strategii do poprawy skuteczności immunoterapii opartych o przeciwciała anty-PD-1. Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023r. poz. 742 z późn. zm.) i niniejszym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Pauliny Pilanc-Kudlek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Jednocześnie, ze względu na wysoką jakość przeprowadzonych badań oraz potencjalne implikacje dla procesów terapeutycznych wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Dr hab. n. med. Magdalena Winiarska

Zakład Immunologii

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Prof. dr hab. med. Radosław Rola
Katedra i Klinika Neurochirurgii
i Neurochirurgii Dziecięcej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej magister Pauliny Pilanc-Kudlek
pt. „**Wpływ inhibitora arginazy oraz peptydu RGD
na mikrośrodowisko nowotworu i odpowiedź na immunoterapię
z użyciem przeciwciała anti-PD-1 w mysim modelu glejaka**”
przygotowanej pod kierunkiem
prof. dr hab. Bożeny Kamińskiej-Kaczmarek
oraz promotor pomocniczej dr Aleksandry Ellert-Mikłaszewskiej
w Pracowni Neurobiologii Molekularnej, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M.
Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

Złośliwe nowotwory glejowe ośrodkowego układu nerwowego stanowią jedno z największych wyzwań dla współczesnej neuroonkologii. Pomimo wyraźnego postępu w technikach operacyjnych umożliwiających uzyskanie rozległych resekcji z niewielkim ryzykiem niekorzystnych następstw neurologicznych oraz wdrożenia zaawansowanych protokołów leczenia wspomagającego z zastosowaniem radiochemioterapii jak dotychczas nie osiągnięto istotnej poprawy całkowitej przeżywalności pacjentów cierpiących na te schorzenia. W tym kontekście istotnego znaczenia nabierają projekty badawcze zorientowane na scharakteryzowanie mechanizmów odpowiedzialnych za odporność guzów glejopochodnych na odpowiedź układu immunologicznego i stworzenie podstaw teoretycznych dla nowych, personalizowanych strategii terapeutycznych dających nadzieję na poprawę wyników leczenia tych, stanowiących wciąż olbrzymie wyzwanie dla współczesnej medycyny, guzów. W powyższy nurt znakomicie wpisuje się praca doktorska magister Pauliny Pilanc-Kudlek, która koncentruje się na przełamywaniu immunosupresji glejaka poprzez dwie nowatorskie interwencje - zastosowanie doustnego inhibitora arginazy

1/2 (OAT-1746) i peptydu RGD blokującego szlak SPP1-integryna w zwierzęcym modelu glejaka.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera 117 stron tekstu, 32 ryciny i 3 tabele podzielonych na rozdziały typowe dla dysertacji doktorskiej. W opinii Recenzenta korzystnym byłoby jednak uzupełnienie jej o spis rycin, które ze względu na znaczenie przedstawionych graficznie danych stanowią kluczowy element dysertacji, nawigowanie której ze spisem rycin byłoby łatwiejsze i bardziej intuicyjne. Pewne zastrzeżenia budzi również oprawa edytorska pracy, w rozdziale Piśmiennictwo wydaje się, że Autorka nie przyjęła jednej obowiązującej konwencji formatowania pozycji piśmiennictwa – pierwsza pozycja przytacza numer tomu i stron publikacji po czym już w pozycji 2 pojawia się jedynie DOI co wprowadza chaos. Wydaje się, że korzystnym byłoby wprowadzenie standardowej konwencji. Powyższe uwagi nie umniejszają jednak w istotny sposób ogólnego wrażenia należytego przygotowania pracy doktorskiej.

We Wstępie, uporządkowanym w logicznie uszeregowane podrozdziały Doktorantka sukcesywnie przedstawia epidemiologię i aktualnie obowiązującą klasyfikację nowotworów glejopochodnych, następnie prezentuje strategie terapeutyczne po czym w interesujący sposób charakteryzuje immunosupresyjne mikrośrodowisko glejaków z uwzględnieniem struktury nacieku limfoidalnego w glejakach złośliwych, charakterystyką komórek mieloidalnych w mikrośrodowisku glejaka, opisem czynników biorącymi udział w rekrutacji i aktywacji komórek nacieku oraz enzymów niezbędnych dla limfocytów T. Następny podrozdział mgr Pilanc-Kudlek poświęca terapiom ukierunkowanym na komórki odpornościowe w mikrośrodowisku nowotworu z uwzględnieniem immunoterapii biernych, immunologicznych punktów kontrolnych i technik blokowania i przeprogramowywania komórek mieloidalnych w glejakach. W opinii Recenzenta Wstęp jest zbyt rozbudowany i mógłby zostać nieco skrócony, co nie zmienia faktu, że w adekwatny sposób prezentuje on podstawy teoretyczne dla sformułowania celu badań w kolejnym rozdziale. W nim to Doktorantka formułuje hipotezę badawczą jaką jest ocena przeciwnowotworowego działania inhibitora arginazy (OAT-1746) oraz peptydu interferującego RGD, a także ich wpływu na mikrośrodowisko i odpowiedź na immunoterapię w mysim modelu glejaka GL261. W tym celu definiuje ona cele szczegółowe obejmujące: ocenę wpływu inhibitora arginazy OAT-1746 oraz przeciwciała anti-PD-1 na wzrost glejaka, analizę wpływu inhibitora arginazy oraz

przeciwciała anti-PD-1 na mikrośrodowisko nowotworu z uwzględnieniem zmian transkryptycznych w komórkach mieloidalnych z glejaków po zastosowaniu OAT-1746 i anti-PD-1, ocenę wpływu peptydu RGD na wzrost glejaka oraz wpływu peptydu RGD w połączeniu z przeciwciałem anti-PD-1 na mikrośrodowisko nowotworu z uwzględnieniem zmian transkryptycznych w komórkach mieloidalnych z glejaków po zastosowaniu peptydu RGD oraz przeciwciała anti-PD-1.

W części badawczej, w kolejnych rozdziałach Doktorantka przedstawia zastosowaną w badaniach linię komórkową po czym w szczegółowy sposób opisuje proces hodowli komórek i stosowane warunki doświadczalne, procedurę tworzenia modelu zwierzęcego, implantacji pomp osmotycznych dla potrzeb dostarczania leku do OUN wraz z charakterystyką stosowanych substancji, metodologią obrazowania bioluminescencyjnego i przyżyciowego obrazowania z zastosowaniem rezonansu magnetycznego wraz z technikami pozyskiwania materiału tkankowego i jego oceny z uwzględnieniem cytometrii przepływowej, metod biologii molekularnej, analizy bioinformatycznej, barwień immunofluorescencyjnych, chromatografii cieczowej wysokiej rozdzielczości połączonej ze spektrometrią mas. Kompleksowość zastosowanej metodologii i niezbędny nakład pracy robią duże wrażenie a zastosowanie wybranych technik badawczych pozwala ocenić zarówno efekty makro- (objętość guza) jak i mikro- (zmiany transkryptyczne). Jedynie w części poświęconej analizie publicznie dostępnych danych oraz analizie statystycznej, w ocenie Recenzenta, zabrakło informacji na temat kryteriów doboru narzędzi statystycznych (w jaki sposób prowadzona była analiza rozkładu zmiennych, na jakiej podstawie podjęto decyzje o zastosowaniu wybranych testów, czy stosowano transformację logarytmiczną danych dla ich normalizacji itp.)

Rozdział 7 Doktorantka poświęca wynikom własnym, oceniając sukcesywnie ekspresję ARG1/ARG2 w glejakach ludzkich zarówno *in silico* poprzez analizę danych zawartych w bazie TCGA jak i wykorzystując scRNA-seq z próbek pacjentów, który ujawnił, że transkrypty pochodzą głównie od komórek nowotworowych oraz GAMs. Następnie Autorka bada ekspresję Arg1/Arg2 w komórkach zastosowanej linii GL261, potwierdza dominację Arg1 w infiltrujących makrofagach (CD11b⁺CD45[^]wysoki) oraz analizuje biodystrybucję i farmakodynamikę OAT-1746 w celu potwierdzenia penetracji bariery krew-mózg. W kolejnym podrozdziale Doktorantka ocenia efektywność OAT-1746 i anti-PD-1 w monoterapii wykazując, że OAT-1746 nie wpłynął na objętość guza natomiast anti-PD-1 zadziałał jedynie u ok. 50 % zwierząt

jednocześnie badając wpływ w/w terapii na elementy mikrośrodowiska (IHC). Szczególnie interesujące wyniki zawierają podrozdziały poświęcone terapii skojarzonej z zastosowaniem OAT-1746 i anty-PD-1 – zastosowanie tej kombinacji silnie opóźniało przyrost bioluminescencji i objętości guza prowadząc do zmian w immunofenotypie guza, zmian w profilu cytokin w osoczu oraz zmian w transkryptomie CD11b⁺ sugerujące przeciwnowotworowe przeprogramowanie GAMs. Analogicznie podrozdziały poświęcone peptydowi RGD obejmują początkowo ocenę ekspresji elementu docelowego dla RGD tj. SPP1/MFGE8-integryny w glejakach ludzkich *in silico* poprzez analizę danych zawartych w bazie TCGA z której wynikało, że SPP1 ulega najsilniejszej ekspresji w GBM (G4) przy czym wysoki jej poziom koreluje ze złym rokowaniem; następnie Doktorantka następnie weryfikowała stabilność i penetrację RGD dostarczanego za pomocą pomp osmotycznych potwierdzając jego obecność zarówno w rdzeniu jak i strefie brzeżnej guza po podaniu do guza. Podobnie jak w przypadku OAT-1746 monoterapia z zastosowaniem peptydu RGD nie wpływała na wielkość guza, ale co interesujące poprawiała wykładniki dobrostanu zwierząt (poprawa masy ciała). W ramach w/w eksperymentów oceniono również transkryptom CD11b⁺ po podaniu RGD, który wykazał zmiany w kierunku wzmożenia prezentacji antygeny i odpowiedzi interferonowej przy jednoczesnym obniżeniu adhezji i supresji limfocytów. Podobnie jak w przypadku kombinacji OAT-1746 i anty-PD-1 połączenie RGD + anty-PD-1 dało dobry efekt przeciwnowotworowy ze zmniejszeniem rozmiarów guzów o ok. 33 % w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Zmianom tym towarzyszyły zmiany w profilu ekspresji cytokin i immunofenotypu nacieku mieloidalnego związane najprawdopodobniej ze wykrytymi zmianami w transkryptomie CD11b⁺.

W dyskusji, podzielonej na 4 podrozdziały Autorka rekapitułuje uzyskane wyniki na tle doniesień literaturowych i konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z rezultatami badań innych autorów w kontekście wszystkich zmiennych analizowanych w rozdziale poświęconym wynikom. Szczególnie interesujący dla czytelnika wydają się być podrozdział 8.4, które w sposób klarowny omawiają i wyjaśniają potencjalne perspektywy i wyzwania związane z użyciem badanych strategii terapeutycznych w praktyce klinicznej.

We wnioskach będących podsumowaniem przeprowadzonej wcześniej analizy naukowej Doktorantka podkreśla, że podawanie OAT-1746 nie wpłynęło na wielkość guzów w porównaniu z grupą kontrolną pomimo zaobserwowanych zmian w profilu

transkryptomycznym komórek CD11b⁺ izolowanych z guzów u zwierząt otrzymujących OAT-1746, który wskazywał na zmniejszoną ekspresję genów zaangażowanych we wspieranie nowotworu oraz hamowania nabywania immunosupresyjnego fenotypu przez komórki mieloidalne w guzie. Natomiast kombinacja inhibitora arginazy z przeciwciałem anti-PD-1 redukowała wzrost glejaka u myszy. Analizując działanie peptydu RGD Autorka doszła do wniosku, że podawanie peptydu RGD nie wpływa na wielkość guza, ale hamuje nagromadzenie w mikrośrodku nowotworu mikrogleju/makrofagów o fenotypie proinwazyjnym. We wnioskach Doktorantka podkreśla również, że zmiany transkryptomiczne wskazały na przeprogramowanie komórek CD11b⁺ związanych z nowotworem po podaniu peptydu RGD oraz silną indukcję odpowiedzi prozapalnej po podaniu anti-PD-1, zwłaszcza w kombinacji z w/w peptydem a kombinacja peptydu RGD oraz anti-PD-1 prowadzi do zwiększonego napływu limfocytów T cytotoksycznych, zmniejszenia odsetka limfocytów regulatorowych oraz spowolnienia wzrostu guza.

Z obowiązku Recenzenta pragnę zwrócić uwagę na kilka niewielkich uchybień, które uwzględnione w wysoce prawdopodobnych dalszych badaniach Doktorantki mogą jeszcze bardziej poprawić rangę jej osiągnięć. Pierwszym z nich jest timing zastosowanych terapii - rozpoczynają się one u zwierząt bezpośrednio po implantacji komórek GL261; nie odzwierciedla to sytuacji klinicznej nawrotowego GBM ani opóźnionego podawania leków. Sama Autorka zwraca uwagę na to ograniczenie i wydaje się ono być kluczowe dla zbliżenia funkcjonowania modelu do realiów klinicznych. Podobnym ograniczeniem z perspektywy klinicznej jest ciągła infuzja doguzowa peptydu RGD przez pompę osmotyczną; rozważyłbym wykonanie analizy jego efektywności po podaniu systemowym, szczególnie w opcji z którymś z dostępnych systemów nośnikowych (liposomy, polimerowe nanokapsułki lub próba czasowego uszkodzenia BBB za pomocą dotętniczego wlewu mannitolu/FUS/) lub alternatywnie poprzez wlew intratekalny peptydu. Kolejnym zagadnieniem wartym rozważenia jest rozszerzenie analizowanych danych modelu zwierzęcego o ocenę wydłużenia życia zwierząt jak również o analizę toksykologiczną pod kątem ewentualnych działań niepożądanych

Całość rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Pilanc-Kudlek oceniam bardzo wysoko. Doktorantka dowiodła, że jest dojrzałym badaczem, potrafiącym dobrać ciekawy temat badawczy o dużym znaczeniu poznawczym i potencjalnym praktycznym. Zebrany materiał został w prawidłowy sposób przeanalizowany oraz stał

się podstawą do wyciągnięcia prawidłowych, logicznych wniosków. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.) zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie mgr Pauliny Pilanc-Kudlek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.