

**Samodzielna Pracownia Diagnostyki i Immunologii Nowotworów  
I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie**

**Kierownik: prof. dr hab. n. med. Iwona Wertel**  
20-093 Lublin, ul. Chodźki 1

Lublin, 15.09.2023 r.

**Recenzja  
rozprawy doktorskiej mgr Anny Mistarz**

pt.: „*Reprogramming the Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer by Oncolytic Virotherapy Targeting  
CXCL12 Chemokine/CXCR4 Receptor Signaling Pathway*”

wykonanej

w Department of Immunology at Roswell Park Comprehensive Cancer Center , Buffalo, United States  
pod opieką promotorów dr hab. Danuty Kozbor oraz prof. dr hab. Hanny Rokity

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska **mgr Anny Mistarz** zatytułowana jak wyżej, została wykonana pod opieką naukową Pani dr hab. Danuty Kozbor oraz Pani prof. dr hab. Hanny Rokity. Rozprawa dotyczy istotnego problemu globalnego jakim jest rak jajnika (OC) i poszukiwania nowych strategii terapeutycznych z wykorzystaniem wirusów onkolitycznych.

Niekorzystne statystyki pięcioletnich przeżyć z powodu OC są wynikiem niepoznanej do końca patogenezы tego nowotworu oraz niskiej skuteczności dostępnego leczenia. Stąd też podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza doskonale wpisuje się w aktualny i niezwykle istotny nurt badań poświęconych opracowywaniu nowych, ukierunkowanych terapii przeciwnowotworowych. Na uwagę zasługuje wybór ścieżki sygnałowej CXCL12/CXCR4 do badań w modelu raka jajnika, który rozprzestrzenia się w obrębie jamy otrzewnej, przez co stanowi dogodny model dla dootrzewnowego podania wirusów onkolitycznych. Szlak CXCL12/CXCR4 pełni istotną rolę w biologii i patogenezы raka jajnika. Uczestniczy w procesach jego waskulogenezy, angiogenezy oraz immunosupresji, przyczyniając się do progresji choroby i powstawania przerzutów. Dlatego też ścieżka sygnałowa CXCL12/CXCR4 stanowi obiecujący cel terapeutyczny.

#### **Ocena poprawności struktury rozprawy**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska ma formę monografii liczącej 93 strony maszynopisu i ma w większości układ typowy dla prac eksperymentalnych. Rozprawa rozpoczyna się *Wykazem Skrótów*, po którym następują *Spis Rycin i Tabel*, *Streszczenia w języku angielskim i polskim*, syntetyczny *Wstęp*, który wprowadza czytelnika w zakres problematyki raka jajnika, heterogennego mikrośrodowiska tego nowotworu oraz roli szlaku CXCR4/CXCL12 w nowotworzeniu. Po *Wstępie* Autorka zamieściła opis *Materiałów i Metod*, *Wyniki*, *Dyskusję*, oraz *Bibliografię*. Niestety, w pracy nie znalazłam wyodrębnionego Celu oraz Wniosków, które w mojej opinii są bardzo istotnym elementem tego typu dysertacji i powinny być wyraźnie wyeksponowane i podkreślone w strukturze monografii. Zwłaszcza, że Doktorantka zaprojektowała i przeprowadziła ciekawe eksperymenty i wykorzystwała do badań wiele nowoczesnych technik. Poza tym w pracy zachowano proporcje pomiędzy poszczególnymi jej rozdziałami.

## Ocena merytoryczna rozprawy

W liczącym 16 stron maszynopisu *Wstępie* Autorka rozprawy opisała aktualne dane statystyczne dotyczące zachorowalności i śmiertelności z powodu OC na świecie. W kolejnych częściach *Wstępu* wspomniała ogólnikowo o aktualnych możliwościach leczenia OC wskazując na potrzebę poszukiwania innych alternatywnych terapii celem poprawy skuteczności leczenia. Następnie Autorka opisała cechy wirusa krowianki oraz przedstawiła zalety onkolitycznej wirusoterapii z wykorzystaniem rekombinowanego wirusa krowianki wykazującego ekspresję antagonisty receptora CXCR4 w modulacji wrodzonej i nabytej odpowiedzi układu immunologicznego. W kolejnej części *Wstępu* Autorka dokonała przeglądu literatury na temat roli szlaku CXCR4/CXCL12 w patogenezie nowotworów. W dalszej kolejności opisała ogólnikowo wybrane populacje komórek układu immunologicznego w mikrośrodowisku raka jajnika, ze szczególnym uwzględnieniem komórek o potencjale immunosupresyjnym tj. makrofagi związane z nowotworem, limfocyty T regulatorowe, oraz fibroblasty. Zagadnienia te zostały omówione krótko i stanowią wyselekcjonowany zbiór podstawowych informacji.

Niewątpliwie atutem *Wstępu* byłoby opisanie roli szlaku CXCR4/CXCL12 w patogenezie i progresji raka jajnika, który został wybrany jako model eksperymentalny do badań.

Według mojej opinii zabrakło informacji na temat najnowszych terapii stosowanych w klinice i/lub badaniach klinicznych tj. terapii antyangiogenne, inhibitory polimerazy poli-ADP rybozy, a także inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych i wykazania dlaczego nie są one skuteczne w terapii OC?

Za niewłaściwe uważam umieszczenie rozdziału 1.6. „*Single-cell RNA sequencing*” w strukturze *Wstępu*. Informacje w nim zawarte dotyczą opisu jednej z zastosowanych w pracy technik badawczych. Korzystniejsze byłoby ich zamieszczenie w *Materiałach i Metodach* lub ewentualnie w *Dyskusji*, celem podkreślenia nowatorskiego aspektu przeprowadzonych przez Doktorantkę badań.

We *Wstępie* zabrakło natomiast wyczerpującego uzasadnienia wyboru problematyki dysertacji i toku rozumowania jaki przeprowadziła Kandydatka przystępując do badań. Nasuwa się pytanie: **Co stanowiło przesłankę do podjęcia badań?** Według mojej opinii takim uzasadnieniem mogłyby być badania własne Doktorantki, do których odnosi się w dyskusji (pozycja piśmiennictwa 151), które jak sama podkreśla stanowiły inspirację do przeprowadzonych badań.

Osobiście zmieniłabym kolejność podrozdziałów w strukturze *Wstępu* tj. po podrozdziale 1.1. „*Ovarian cancer*” bardziej sensowne wydaje się umieszczenie charakterystyki i specyfiki mikrośrodowiska raka jajnika, w tym wybranych populacji komórek układu immunologicznego, następnie roli chemokin ze szczególnym uwzględnieniem szlaku CXCR4/CXCL12 w patogenezie innych nowotworów i raka jajnika, opisu obecnie stosowanych terapii w leczeniu pacjentek z OC, ograniczeń tych terapii jako luki do uzupełnienia, a następnie wyeksponowałabym zalety onkolitycznej wirusoterapii z wykorzystaniem rekombinowanego wirusa krowianki. Taka kolejność stanowiłaby płynne i uzasadnione przejście do celu badań.

Na stronie 24 *Wstępu* uwagę zwraca nieprecyzyjne sformułowanie “benign OC” „*Compared with patients with benign OC, the proportion of M2 macrophage infiltration is significantly increased in peritoneal metastases*”. Proszę o komentarz w tej kwestii.

Należy też pamiętać o wyjaśnianiu używanych skrótów w momencie ich pierwszego pojawienia się w tekście pracy (dla przykładu skrót VEGF-A pojawia się w pracy na str. 16, a jego wyjaśnienie Autorka umieszcza na stronie kolejnej). Jest to istotne w przypadku tak olbrzymiej liczby skrótów występujących w tekście rozprawy.

Autorka rozprawy dołożyła starań, żeby wzbogacić tekst *Wstępu* rycinami, pomocnymi w zrozumieniu treści.

W pracy brakuje określenia **Celu** pracy, który stanowi bardzo ważną część w strukturze dysertacji. Tym samym brakuje jasnego uzasadnienia wyboru tematyki prowadzonych badań. Cel jest formułowany dla podkreślenia istoty problemów, które naukowiec pragnie rozwiązać w prowadzonych badaniach. Dlatego też powinien być wyraźnie wyeksponowany. **Poproszę o jasne sprecyzowanie celu pracy podczas obrony.**

Rozdział *Material i Metody* jest opisany dokładnie. Metodyka badań została prawidłowo dobrana do rodzaju przeprowadzonych eksperymentów. W rozprawie podano informację o zgodzie Komisji Bioetycznej uzyskanej na przeprowadzenie badań. Rozdział ten zawiera szczegółowe informacje dotyczące charakterystyki modeli badawczych oraz zastosowanych metod badawczych. W tym miejscu pragnę podkreślić wykorzystanie przez Doktorantkę dwóch mysich modeli badawczych: antygenowo-dziewicznych myszy dzikiego typu oraz myszy transgenicznym (TgMISIIR-TAg-Low) dla których antygen T SV40 pełnił funkcję neoantygeny. Użyte modele zwierzęce zostały pozyskane dzięki współpracy ze znanymi na świecie ośrodkami naukowymi. Autorka pracy zamieściła odpowiednią adnotację odnośnie ich pochodzenia.

Na uwagę zasługuje ponadto różnorodność wykorzystanych, nowoczesnych technik badawczych, które Doktorantka wykonywała samodzielnie takich jak: techniki molekularne, w tym sekwencjonowanie nowej generacji (NGS), analizy na poziomie pojedynczej komórki, sortowanie komórek, cytometria przepływowa, złożone badania *in vivo* na wspomnianych wcześniej modelach mysich, co jest niewątpliwie olbrzymią zaletą pracy.

Celem molekularnym wybranym przez Doktorantkę była ścieżka sygnałowa CXCR4/CXCL12, która odgrywa istotną rolę w patogenezie wielu nowotworów. Receptor CXCR4 ulega m.in. ekspresji w komórkach raka jajnika, które ponadto wykazują zdolność do produkcji chemokiny CXCL12. Szlak ten uczestniczy zarówno w autokrynych jak i parakrynych oddziaływaniach pomiędzy różnymi populacjami komórek w mikrośrodowisku nowotworowym. Bierze udział w waskulogenezie (*rekrutacja prekursorów komórek śródbłonkowych EPC*), angiogenezie (*popudżanie wydzielania VEGF przez komórki nowotworowe*), ponadto wykazuje działanie immunosupresyjne (*rekrutacja MDSCs, plazmocytoidalnych DCs, Tregs*). Dzięki tym mechanizmom pobudza wzrost, migrację i inwazyjność komórek nowotworowych, stymulując progresję i tworzenie przerzutów OC.

Doktorantka użyła w eksperymentach rekombinowanego wirusa krowianki, z wklonowanym genem antagonisty receptora CXCR4 (OV-CXCR4-A). Wykorzystała szczepy pozbawione genów dla czynnika wzrostu wirusa krowianki (VGF) oraz kinazy tymidynowej (TK), które posiadają obniżoną zdolność namnażania się w komórkach prawidłowych. Jako swoiste kontrole posłużyły wirusy z wbudowanym fragmentem Fc (OV-Fc) lub z białkiem EGFP (OV-EGFP). Następnie Doktorantka oceniała skuteczność działania tak zmodyfikowanego wirusa krowianki w zwierzęcych modelach mysich raków jajnika (antygenowo-dziewicznych myszy dzikiego typu oraz transgenicznym myszy TgMISIIR-TAg-Low). Ponadto Doktorantka oceniała zmiany w mikrośrodowisku guza indukowane przez zmodyfikowane wirusy. Ten aspekt przeprowadzonych badań oceniam wysoko, ze względu na zastosowanie nowatorskich i pracochłonnych technik badawczych umożliwiających modulację aktywności komórek układu immunologicznego, oraz potencjał aplikacyjny przeprowadzonych eksperymentów.

Układ tego rozdziału jest przejrzysty. Autorka rozprawy wzbogaciła rozdział rycinami oraz zestawieniami tabelarycznymi, co zwiększa jego klarowność. Wykonanie ambitnych, pracochłonnych i czasochłonnych eksperymentów, nie budzi zastrzeżeń. Autorka szczegółowo opisuje wykonanie poszczególnych etapów oznaczeń, co dowodzi rzetelności wykonanych badań, a także umożliwia ich powtórzenie.

**Wyniki** opisane są na 29 stronach i przedstawione na 25 wykresach. Przedstawione są opisowo oraz przy pomocy precyzyjnie opracowanych rycin i wykresów odzwierciedlających obliczenia statystyczne. Przeprowadzenie tak obszernych analiz i zestawień wymagało dużej skrupulatności i nakładu pracy.

W przeprowadzonych badaniach *in vivo* Doktorantka oceniła wpływ zaprojektowanej terapii wirusowej na wzrost guza (raka jajnika) oraz długość przeżycia zwierząt doświadczalnych. Ponadto skoncentrowała się na ocenie wybranych parametrów układu immunologicznego w mikrośrodowisku wyindukowanego guza jajnika i porównała uzyskane wyniki w dwóch wcześniej wspomnianych mysich modelach

eksperymentalnych. Wyniki tych badań pokazują, że zastosowany konstrukt OV-CXCR4-A w badaniach *in vivo* hamował wzrost guza nowotworowego. Obserwowane przeżycia zarówno w przypadku modelu myszy typu dzikiego jak i transgenicznego były dłuższe (odpowiednio o 10 i 4 dni) w porównaniu do modeli nieleczonych, jednakże obserwowana różnica nie osiągnęła istotności statystycznej.

Co interesujące, w badaniach *in vivo* Autorka pracy wykazała różnice w profilu ekspresji genów oraz stopniu aktywacji ocenionych populacji komórek układu immunologicznego w zależności od wykorzystanego modelu eksperymentalnego. W mikrośrodku płynu otrzewnowego myszy transgenicznych (TgMISIIR-TAg-Low) dla których antygen T SV40 pełnił funkcję neoantygeny wykazano dominację makrofagów związanych z nowotworem o fenotypie M2 oraz fibroblastów o potencjale immunosupresyjnym. Natomiast u myszy typu dzikiego, nie poddanych terapii wykazano obecność limfocytów cytotoksycznych skierowanych przeciwko antygenowi T SV40, porównywalny odsetek makrofagów M1 i M2 oraz obecność fibroblastów o potencjale immunostymulującym.

Ponadto, Doktorantka wykazała różnice w nasileniu odpowiedzi immunologicznej indukowanej w wyniku podania rekombinowanego wirusa krowianki wykazującego ekspresję antagonisty receptora CXCR4 (terapia OV-CXCR4-A). U myszy typu dzikiego poddanych terapii, limfocyty TCD8<sup>+</sup> cechowały się podwyższoną ekspresją genów warunkujących ich różnicowanie i przeżycie, aktywację i funkcje cytotoksyczne, podczas gdy u myszy transgenicznych komórki te posiadały fenotyp komórek „wyczerpanych”. Charakteryzowały się one zwiększoną ekspresją genów związanych z „wyczerpaniem” oraz słabszym wiązaniem tetrameru TCRtag-I w porównaniu do myszy typu dzikiego. W testach cytotoksyczności limfocyty TCD8<sup>+</sup> u myszy transgenicznych (TgMISIIR-TAg-Low) wykazywały niższą aktywność cytotoksyczną po terapii OV-CXCR4-A w porównaniu do ich odpowiedników u myszy typu dzikiego. Usunięcie limfocytów TCD8<sup>+</sup> dowiodło, że były one komórkami odpowiedzialnymi za terapeutyczny wpływ zastosowanej terapii wirusowej OV-CXCR4-A. Co interesujące, Doktorantka zaobserwowała, że rozprzestrzenianie się antygenów powodowane wirusoterpią OV-CXCR4-A oraz aktywacja antygeny T SV40 mogą przeprogramować niewrażliwe limfocyty T CD8<sup>+</sup> skierowane przeciwko komórkom nowotworowym u myszy TgMISIIR-TAg-Low prowadząc do eliminacji fibroblastów oraz polaryzacji makrofagów w kierunku typu M1.

Uzyskane wyniki są ciekawe w kontekście ich zastosowania w praktyce klinicznej i wskazują na możliwość modulacji niewrażliwych komórek układu immunologicznego dla zwiększenia skuteczności terapii przeciwnowotworowej. Przeprowadzone badania wskazują na potencjał mysiego modelu TgMISIIR-TAg-Low w przedklinicznej ocenie terapeutyków i z pewnością powinny być kontynuowane.

#### **Uwagi/Pytania do tej części pracy:**

1. Gdzie były podawane rekombinowane wirusy z wbudowanym fragmentem Fc (OV-CXCR4-A) albo z białkiem EGFP (OV-EGFP)? doguzowo (jak podaje Autorka w rozdziale 3. Results (3.1) czy dootrzewnowo (jak podaje w Metodycy w rozdziale *in vivo* Studies, 2.3?)
2. W rozdziale *Wyniki* Doktorantka, poza opisem wyników umieszcza odniesienia do rezultatów innych autorów. Konfrontacje te powinny znaleźć się w Dyskusji.
3. Doktorantka w *Wynikach* redaguje stwierdzenia, które mogłyby mieć charakter wniosków (Results str.43-44). Szkoda, że nie zostały one wyeksponowane jako odrębny rozdział pracy tj. *Wnioski*, o czym wspomniałam już wcześniej przy ocenie struktury pracy.

Chciałabym ponadto zaznaczyć, że niektóre wyniki badań przedstawione w rozprawie zostały już wcześniej opublikowane przez Autorkę w *Mol. Ther. Oncolytics* 28, 230-248 (2023), w pracy zatytułowanej “*Reprogramming the tumor microenvironment leverages CD8<sup>+</sup> T cell responses to a shared tumor/self antigen in ovarian cancer*” autorstwa **Mistarz, A.**, Winkler, M., Battaglia, S., Liu, S., Hutson, A., Rokita, H., Gambotto, A., Odunsi, K.O., Singh, P.K., McGray, A.J.R., Wang, J., Kozbor, D. Należałoby podkreślić, które elementy (ryciny, wykresy) i w jakim zakresie zostały zaczerpnięte z tej publikacji. **Proszę o wyjaśnienie podczas obrony na czym polega odmienność i oryginalność badań uwzględnionych w rozprawie Doktorantki w stosunku do wyników wcześniej opublikowanych.**

**Dyskusja** ujęta na 6 stronach rozpoczyna się omówieniem uzyskanych wyników. Doktorantka odnosi się do rezultatów opisanych w rozdziale *Wyniki* a także do dwóch opublikowanych już wcześniej prac własnego autorstwa/współautorstwa zespołu z którym współpracuje. Czasami też odwołuje się do efektów badań innych autorów. Brakuje w tym rozdziale szerszej konfrontacji uzyskanych wyników własnych Doktorantki z rezultatami przedstawionymi w literaturze naukowej.

W pracy brakuje wyeksponowania **Wniosków** wynikających z przeprowadzonych badań i podsumowujących rozprawę doktorską. **Wnioski** są bardzo istotnym elementem dysertacji i powinny być wyraźnie wyeksponowane i podkreślone w strukturze monografii. **Proszę o zredagowanie Wniosków wynikających z przeprowadzonych przez Autorkę badań i przedstawienie ich w trakcie obrony.**

**Bibliografia** obejmuje 152 pozycje prac anglojęzycznych, uporządkowanych w kolejności cytowania. Nie mam większych zastrzeżeń odnośnie sposobu wykorzystania przedstawionych prac. Aczkolwiek w niektórych miejscach Autorka nie podaje źródła informacji (przykładowo ostatnie trzy zdania - podrozdział **1.4. Tumor microenvironment**, czy do fragmentu na str.75-76, gdzie pisze „*The current literature suggests*”

W **Streszczeniu** w języku polskim i angielskim brakuje wyodrębnionego celu i wniosków.

### Ocena strony edytorskiej rozprawy

Rozprawa napisana jest w języku angielskim. Uwagę zwraca szczegółowo dopracowana szata graficzna i sposób prezentacji wyników badań Doktorantki. Doktorantka dołożyła starań, żeby wzbogacić tekst zestawieniami tabelarycznymi, wykresami i rycinami, pomocnymi w zrozumieniu treści. Niewątpliwie ułatwiają one analizę wyników złożonych eksperymentów. Podział na rozdziały i podrozdziały jest jasny i czytelny.

W pracy występują pewne nieprecyzyjne sformułowania. Poproszę o ich wyjaśnienie:

- „tumorogenność komórek raka jajnika” (Streszczenie, str.12)
- „antygenowo-naiwne myszy” (Streszczenie, str.12)

### Podsumowanie recenzji

Podsumowując pragnę podkreślić, że przedstawiona do recenzji praca **mgr Anny Mistarz** pt. „*Reprogramming the Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer by Oncolytic Virotherapy Targeting CXCL12 Chemokine/CXCR4 Receptor Signaling Pathway*” jest opracowaniem interesującego problemu naukowego. Doktorantka wykazała duże umiejętności prowadzenia eksperymentalnych badań naukowych, zdolność wnikliwej analizy i interpretacji wyników. W swojej pracy zaprezentowała zróżnicowany warsztat metodyczny. Recenzowana dysertacja posiada oryginalny aspekt poznawczy obejmujący weryfikację aktywności onkolitycznej zmodyfikowanego wirusa krowianki w modelach mysich *in vivo*. Przeprowadzone badania stanowią podłoże dla dalszych prac, które mogą okazać się pomocne w opracowaniu skutecznej terapii przeciwnowotworowej. Otrzymane wyniki otwierają dalsze perspektywy badawcze.

W związku z powyższym stwierdzam, że praca pt. „*Reprogramming the Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer by Oncolytic Virotherapy Targeting CXCL12 Chemokine/CXCR4 Receptor Signaling Pathway*”, **spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r., Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz.1668 z póź. zm.)**.

Tym samym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Kolegium Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Anny Mistarz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

**Samodzielna Pracownia Diagnostyki  
i Immunologii Nowotworów  
UM w Lublinie**

Kierownik  
**Prof. dr hab. n. med. Iwona Wertel**