

**Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej**  
**Uniwersytet Medyczny w Lublinie**  
**Lublin 20-090**  
ul. Chodzki 1  
tel./fax. +48 81448 6630  
Kierownik:  
Prof. dr hab. Krzysztof Giannopoulos



**Experimental Hematooncology**  
**Department**  
**Medical University**  
**of Lublin**  
**20-090 Lublin, POLAND**  
1 Chodzki St.  
tel./fax. +48 81448 6630  
Head:  
Prof. Krzysztof Giannopoulos

Lublin 24.10.2021

## **OCENA**

### **ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH**

**Mgr Anny Sosnowskiej**

**pt. " Zbadanie roli arginaz i mechanizmów przeciwnowotworowego działania inhibitorów arginazy"**

Identyfikacja mechanizmów ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego stanowi aktualny temat badawczy, a którego wyniki mogą wpłynąć na opracowanie przyszłych terapii. Jednym z przykładów może być ścieżka przekazywania sygnału przez PD-1/PD-1L, której inhibitory odblokowują przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną. Obecnie przeciwciała blokujące zarówno PD-1 jak i PD-1L stanowią ważną opcję terapeutyczną dla chorych na nowotwory lite jak również rozrosty komórek układu krwiotwórczego i chłonnego. W mikrośrodowisku nowotworu istnieje szereg substancji wytwarzanych przez komórki nowotworowe, które regulują odpowiedź układu odpornościowego. Jednym z tych elementów immunosupresji jest obecność arginazy, która degradowuje argininę – substrat niezbędny proliferującym limfocytom T do udziału w skutecznej odpowiedzi immunologicznej. Obecność arginazy jak również jej negatywne znaczenie rokownicze zostało opisane w wielu rodzajach nowotworów. W tematykę oceny znaczenia arginazy w nowotworzeniu o wpisuje się przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska.

Celem pracy była ocena znaczenia ekspresji arginaz w mikrośrodowisku nowotworu na wzrost guza *in vivo* oraz odpowiedź przeciwnowotworową. Autorka analizowała również wpływ rekombinowanych arginaz oraz leczenie inhibitorami arginazy na ekspresję ARG1 i ARG2 oraz proliferację limfocytów T, ekspresję CD3 i produkcję cytokin. Efekt przeciwnowotworowy inhibitorów arginazy był analizowany w modelu *in vivo* raka płuca.

**Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej**  
**Uniwersytet Medyczny w Lublinie**  
**Lublin 20-090**  
ul. Chodzki 1  
tel./fax. +48 81448 6630  
Kierownik:  
Prof. dr hab. Krzysztof Giannopoulos



**Experimental Hematooncology**  
**Department**  
**Medical University**  
**of Lublin**  
**20-090 Lublin, POLAND**  
1 Chodzki St.  
tel./fax. +48 81448 6630  
Head:  
Prof. Krzysztof Giannopoulos

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest opracowaniem napisanym w języku angielskim i ma układ typowy dla tego typu opracowań. Liczy 157 stron maszynopisu, w tym 3 tabele i aż 48 rycin. Całość pracy opatrzona jest 312 pozycjami piśmiennictwa, z czego większość pochodzi z ostatnich 10 lat, oraz opublikowana została w międzynarodowych czasopismach.

Rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane tego typu opracowaniom. Warsztat metodologiczny Doktorantki robi duże wrażenie i odpowiada nowoczesnej analizie nowych substancji, których efekt przeciwnowotworowy jest związany z modyfikacją mechanizmów immunologicznych. Godną podkreślenia jest biegłość Kandydatki na stopień doktora, stosowania różnych metod badawczych z obszaru biologii molekularnej, cytometrii, Western Blot, badań czynnościowych oraz badań w modelach zwierzęcych. W sposób konsekwentny Doktorantka analizuje mechanizm działania arginazy jako jeden z patofizjologicznych celów do terapii mającej na celu hamowanie ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego. Opracowanie na wielu poziomach analiz – ze strony ekspresji arginazy, konsekwencji czynnościowych jej nadmiaru lub braku, odniesienie do wpływu na produkt działania enzymu oraz przejście do analizy wpływu na odpowiedź T-komórkową i badania w modelu zwierzęcym są przeprowadzone w sposób wzorowy i kompleksowy. Autorka dowodzi, że niedobór arginazy opóźnia, a jej nadmiar przyspiesza progresję nowotworu, w sposób zależny od aktywacji układu odpornościowego. Rekombinowane arginazy ARG1 i ARG2 hamują odpowiedź T-komórkową, a stosowanie inhibitorów ARG stymuluje proliferację limfocytów T, ekspresję CD3 oraz wytwarzanie cytokin. Z analizowanych inhibitorów ARG nowe konstrukty OAT-1746 i OAT-1617 działają lepiej niż ABH. Z nich wydaje się, że OAT-1746 działa najskuteczniej i hamuje rozwój guza, aktywując odpowiedź T-komórkową.

Obowiązkiem Recenzenta jest zwrócenie uwagi na kilka elementów, które wymagają lepszego wytłumaczenia lub doprecyzowania w tekście.

Na stronie tytułowej jest data 2020, a praca została mi przysłana do recenzji w lipcu 2021.

Na str. 79 w rycinie 10 błędnie opisano oś fluorescencji jako YARG przy guzie 10mm, a nie jako YFR jak dla innych wielkości guza.

**Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej**  
**Uniwersytet Medyczny w Lublinie**  
**Lublin 20-090**  
ul. Chodzki 1  
tel./fax. +48 81448 6630  
Kierownik:  
Prof. dr hab. Krzysztof Giannopoulos



**Experimental Hematooncology**  
**Department**  
**Medical University**  
**of Lublin**  
**20-090 Lublin, POLAND**  
1 Chodzki St.  
tel./fax. +48 81448 6630  
Head:  
Prof. Krzysztof Giannopoulos

Doświadczenia dotyczące ekspresji ARG1 w różnych liniach komórkowych wymagają lepszego wyjaśnienia. Wyniki cytometryczne na Ryc.20 wskazują na bardzo ograniczoną ekspresję w liniach LCC, E0771, PANC02, ID8, 4T1 i B16F10, brak w linii A20 oraz największą po indukcji w linii B16F10-ARG1, przy zauważaniu wyższej fluorescencji w kontroli FMO. Wyniki Western Blot wskazują zaś na prążek białkowy w linii A20. Konsekwencji wymaga również nazewnictwo linii PANC02 czy PAN02 – obie nazwy pojawiają się zamiennie nawet w ramach tego samego doświadczenia.

Na stronie 109 wyniki obserwacji zgodnie z metodyką powinny być z dnia 18, a na rycinie 41 jest wynik z dnia 20 pomimo legendy wskazującej na analizy wielości guza w dniu 18. Wyniki dla inhibitora ABH przedstawione na rycinie 42 są konsekwentnie z dnia 18. O ile zrozumiałe są inne czasy obserwacji w przypadku dodawania inhibitora PD-1 lub/i DMXAA do inhibitorów ARG, to ocena tej samej grupy inhibitorów w monoterapii wymaga tego samego modelu odczytu aktywności substancji.

Powyższe uwagi nie wpływają istotnie na bardzo wysoką ocenę pracy doktorskiej. Uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 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. 5 z późn. zm.). Praca jest nowatorska, warsztat badawczy doskonały, a uzyskane wyniki mogą się przyczynić do opracowania nowej metody terapii. Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Anny Sosnowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie tej pracy.

Prof. dr hab. Krzysztof Giannopoulos

Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie